

Marjo Mäkipelto

**KingFisher Flex -automaatin soveltuvuus teolliseen
utaretulehdusnäytteiden eristämiseen**

Opinnäytetyö

Kevät 2013

Tekniikan ja liikenteen yksikkö

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

Opinnäytetyön tiivistelmä

Koulutusyksikkö: Tekniikka ja liikenne

Koulutusohjelma: Bio- ja elintarviketekniikka

Suuntautumisvaihtoehto: yleinen

Tekijä: Marjo Mäkipelto

Työn nimi: KingFisher Flex -automaatin soveltuvuus teolliseen utaretulehdusnäytteiden eristämiseen

Ohjaaja: Pasi Junell

Vuosi: 2013

Sivumäärä: 70

Liitteiden lukumäärä: 2

KingFisher Flex on PCR-tekniikkaan kehitetty magneettipartikkeleiden avulla toimiva DNA:n eristysautomaatti. Tämä työ käsittelee automaatin beta-testausta, joka suoritettiin Valion Seinäjoen aluelaboratoriossa keväällä 2012. Beta-testauksessa eristettiin 1500 utaretulehdusnäytettä kahdella eri eristysmenetelmällä. Utaretulehdusnäytteiden eristysmenetelminä käytettiin perinteistä paljon käsityötä vaativaa menetelmää ja KingFisher Flex -automaattia.

Beta-testauksen tarkoituksena oli selvittää eristysautomaatin soveltuvuutta utaretulehdusnäytteille. Samalla oli tarkoitus kartoittaa mahdollisia automaatilla saavutettavia etuja sekä menetelmän kehittämiskohteita. Automaatin tavoitteena oli nopeuttaa ja helpottaa utaretulehdusnäytteiden diagnosointia, minkä vuoksi työssä tutkitaan myös laitteen hankinnan kannattavuutta.

Automaatti osoittautui laitevalmistajan väittämien mukaan tehokkaammaksi ja vaivattommaksi eristystavaksi kuin perinteinen. Eri menetelmien tulosten välillä ei ollut merkittäviä poikkeamia, minkä vuoksi eristysautomaatin voitiin todeta soveltuvaksi myös utaretulehdusnäytteiden eristämiseen. Koska uusi eristysmenetelmä eroaa perinteisestä DNA:n eristämisestä, on menetelmään kuitenkin perehdytettävä käyttäjät hyvin luotettavien tulosten saavuttamiseksi.

Avainsanat: KingFisher Flex, PCR, utaretulehdus, bakteerit, DNA

SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Thesis abstract

Faculty: School of Technology

Degree Programme: Food Processing and Biotechnology

Specialisation: Food Technology

Author: Marjo Mäkipelto

Title of thesis: KingFisher Flex's suitability for industrial isolation of mastitis samples

Supervisor: Pasi Junell

Year: 2013

Number of pages: 70

Number of appendices: 2

KingFisher Flex is a magnetic particle processor designed to be used with PCR-technique. The thesis is based on KingFisher's beta-testing, which was completed at Valio Seinäjoki laboratory in 2012. The beta-testing included 1500 mastitis samples. Bacteria were isolated from the samples with two different techniques. The techniques were traditional, which meant a lot of handwork, and a new KingFisher Flex -robot.

In the study, KingFisher Flex was tested to mastitis samples. For Valio, it was important to find out the better isolation technique and to solve if the KingFisher Flex is a good investment. A part of the thesis was collecting opinions about the robot and the new method.

KingFisher flex proved to be more efficient and to use an easier method than the original method. The results between the two methods were quite similar in bacteria, but had differences in the isolation process. Because this new method is slightly different from the original, the users should be introduced carefully to it to get reliable results.

Keywords: KingFisher Flex, PCR, mastitis, bacteria, DNA

SISÄLTÖ

Opinnäytetyön tiivistelmä.....	2
Thesis abstract.....	3
SISÄLTÖ.....	4
Kuvio- ja taulukkoluettelo.....	6
Käytetyt termit ja lyhenteet	8
1 JOHDANTO	1
2 TAVOITTEET.....	2
3 MAIDON TUOTANTO	3
3.1 Laktaatiokausi	4
3.2 Lypsytapahtuma.....	4
3.3 Maidolle tehtävistä tarkastuksista.....	5
4 UTARETULEHDUS ELI MASTIITTI	7
4.1 Mastiittinäyte	8
4.2 Utaretulehdusbakteereja	9
4.2.1 Ympäristöperäiset bakteerit	9
4.2.2 Tartunnalliset bakteerit.....	10
4.3 Taudin ilmentyminen	12
4.4 Maitotuotteista.....	13
5 UTARETULEHDUSNÄYTTEIDEN ANALYSOINTI.....	16
5.1 PCR	16
5.1.1 PCR-ajolevy	19
5.2 Utaretulehdusnäytteiden eristäminen.....	20
5.2.1 Utaretulehdusnäytteiden perinteinen eristäminen	21
5.3 KingFisher Flex -eritysaatomaatti.....	22
5.3.1 Toimintaperiaate	23
5.3.2 Utaretulehdusnäytteen eristäminen automaattilla	26
5.3.3 Eritysmenetelmän kehittyminen	27
6 TULOKSET	30
6.1 Tulosten tulkitseminen	31

6.2 Perehdytysajojen tulokset	36
6.3 Beta-testausajojen tulokset	38
6.4 Kontaminaatiot	41
6.5 Ajanoton tulokset.....	43
6.6 Raegenssien ja pipetinkärkien minimikulutus.....	45
6.7 Kokemusperäiset kokemukset	47
7 LOPPUPÄÄTELMÄT.....	49
7.1 Eristysmenetelmän luotettavuus	49
7.2 KingFisher-eristysautomaatin edut ja haitat	52
7.3 Tutkimuksen seurauksia	54
8 YHTEENVETO.....	56
LÄHTEET	58
LIITE 1: Perinteisen eristysmenetelmän pikaohje	61
LIITE 2: KingFisher Flex eristyksen pikaohje (ennen ohjelmistopäivitystä)	62

Kuvio- ja taulukkoluetelo

Kuvio 1. Maitotilojen ja lehmien lukumäärä.....	3
Kuvio 3. PCR-ajolevyn pipetointi.....	19
Kuvio 4. KingFisher Flex –eristysautomaatti.....	23
Kuvio 5. Magneettipartikkelien rakenne ja KingFisherin periaate.....	25
Kuvio 6. KingFisher Flexin täyttövaihe.....	26
Kuvio 7. Eristysmenetelmien lohkokaaviot.....	28
Kuvio 8. KingFisher Flexin päivitetysteristyksen lämpötilakäyrä.....	29
Kuvio 9. Bakteerin PCR-ajon kasvukäyrä.....	30
Kuvio 10. PCR-ajon levykohtainen tulostaulu.....	31
Kuvio 11. PCR-ajon näytekohtainen tuloksenttä.....	34
Kuvio 12. Näytteen sisäiset kontrollikäyrät.....	35
Kuvio 13. Esimerkki IAC-fail-tilanteesta.....	36
Kuvio 14. Tuloserot bakteereittain.....	40
Kuvio 15. Eristysmenetelmien eristysien kesto.....	45
Taulukko 1. Lian koostumus ja puhdistaminen.....	5
Taulukko 2. Tuottajamaidosta tehtävät tarkastukset. (Rajala 1993, 68-69.)	6
Taulukko 3. Menetykset äkillisestä utaretulehduksesta. (Brofeldt 1991, 8.).....	7
Taulukko 4. Menetykset piilevästä utaretulehduksesta. (Brofeldt 1993, 9.)	8
Taulukko 5. Utaretulehduksen aiheuttamat muutokset maidossa. (Bylund 1995, 2.) (Blowey & Edmondson 2010, 3.).....	14
Taulukko 6. Utaretulehdusmaidon vaikutus prosessointiin. (Korhonen 1993, 311.)	15
Taulukko 7. Alukeseosten sisältämät bakteerit.....	20
Taulukko 8. Eristysreagenssit.....	21
Taulukko 9. KingFisher Flex -erisyksen ReM-seoksen valmistus.....	27
Taulukko 10. Utaretulehdusbakteerien Ct-arvorajat.....	33
Taulukko 11. Tulosten yhteneväisyys.....	39
Taulukko 12. Tuloksissa epäillyt kontaminaatiot.....	42
Taulukko 13. Valion tuloksista laskettu KingFisher Flex –eristysen ”hands-on-time” –aika.....	44

Taulukko 14. Pipetinkärkien kulutus.....	46
Taulukko 15. Reagenssien kulutus.	46
Taulukko 16. Uusintojen määrät eri menetelmillä.	51
Taulukko 17. Pipetinkärkien kulutus eri menetelmillä.....	55

Käytetyt termit ja lyhenteet

Aлке	(Primer) DNA- tai RNA-jakso, joka toimii aloitusjaksona nukleiinihapposynteesissä (Suominen & Ollikka 2004, 125).
Ct	PCR-ajossa DNA:n määrän yksikkö (Palva 2007, 17).
DNA	Deoksiribonukleiinihappo, deoksiribonukleotideistä koostuva polymeeri, solun perintöaine (Suominen & Ollikka 2004, 125).
Kontaminaatio	Pieni määrä DNA:ta, joka ei ole peräisin itse monistettavasta näytteestä (Suominen & Ollikka 2004, 111).
Mastiitti	Utareen tulehtuminen, joka aiheuttaa muutoksia maidossa ja vetimissä, voi olla myös oireeton (Blowey & Edmondson 2010, 1).
PCR	Polymeraasiketjureaktio, nukleiinihappojen monistamista korkeassa lämpötilassa (Suominen & Ollikka 2004, 128).
Proteinaasi	Valkuaisaineita pilkkova entsyymi
Templaatti	Malli; nukleiinihappojuoste, jota käytetään vastinnauhan synteesin mallina

1 JOHDANTO

Utaretulehdus on lypsylehmien yleisin sairaus. Tulehdusmaito aiheuttaa tuottajille taloudellisia tappioita, koska se poikkeaa normaalista valkuisaineiden, solupitoisuuden ja entsyymisisällön suhteen, mikä vaikuttaa maidon jalostusprosesseihin. (Brofeldt 1991, 9.) Utaretulehdusten ehkäisemisessä on tärkeintä huolehtia utareiden puhtaudesta. Utaretulehdusten määrä Suomessa onkin ollut vähenemässä jo 20 vuotta, ja sama suuntaus on havaittavissa muissakin Euroopan maissa (Torikka 2013, 8) & (Blowey & Edmondson 2010, 1–2). Yleisimmät utaretulehdusta aiheuttavat bakteerit ovat Staphylokokit ja Streptokokit sekä kolibakteerit (Honkanen-Buzalski 1991, 63).

Tässä työssä käsitellään bakteerien DNA:n eristämistä mastiitti- eli utaretulehdusnäytteistä. DNA:n monistamiseen ja bakteerien diagnosointiin käytetään PCR-tekniikkaa. Työn tarkoituksena on suorittaa ThermoFisherin uuden laitteen KingFisher Flexin beta-testaus mastiittinäytteillä. Testauksessa suoritettiin noin 1500 näytteen rinnakkaiseristykset, joista tutkittiin laitteen toimivuutta. Rinnakkaisajot tehtiin vanhalla käytössä olleella menetelmällä, joka on suurimmaksi osaksi käsityötä. Tutkimukset ja laitteen testaaminen on suoritettu Valion Seinäjoen aluelaboratoriossa keväällä 2012.

Tuloksissa tarkasteltiin miten kahden eri DNA-eristysmenetelmän tulokset poikkesivat toisistaan. Samalla kartoitettiin, saavutettaisiinko automaattilla eristämiseen siirtymällä etuja. Lopuksi tarkastellaan, olisiko uusi eristysautomaatti kannattava hankinta.

KingFisher Flex osoittautui laitevalmistajan mukaan nopeaksi ja työntekijöiden työmäärää vähentäväksi eristysmenetelmäksi. Tällöin työntekijät pystyivät olemaan tehokkaampia työpäivänsä aikana ja myös tulosten lähettäminen tuottajille nopeutui. Työssä on huomioitu hieman myös työntekijöiden mielipiteitä uuden laitteen käyttämisestä, ja heidän näkemyksensä ovat samansuuntaiset kuin laitevalmistajan ThermoFisherin väittämät.

2 TAVOITTEET

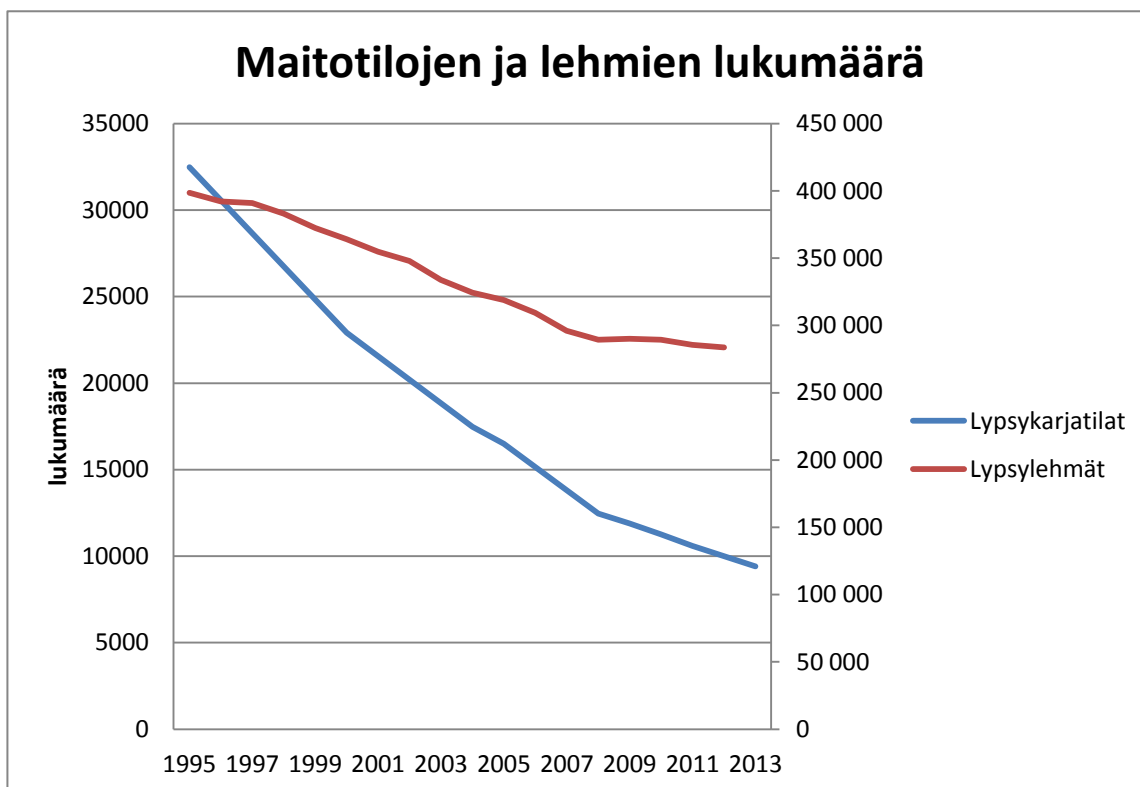
Työn tavoitteena oli suorittaa uuden KingFisher Flex-eristysautomaatin beta-testaus. Beta-testauksella varmistettiin automaatin eristystarkkuus ja soveltuvuus utaretulehdusnäytteille. Tämä tarkoittaa sitä, että näytteiden tulosten pitäisi olla yhteneväisiä toistensa kanssa vanhan ja uuden menetelmän kesken eli näytteistä oli löydyttävä suunnilleen samat bakteerit yhtä voimakkaina.

Beta-testauksessa selvitettiin myös mahdollisia uuden eristysmenetelmän etuja ja kehityskohteita. Oletusarvona automaatin tulisi nopeuttaa ja helpottaa utaretulehdusnäytteiden eristysvaiheita. Työssä vertailtiin, kauanko kahden eri menetelmän työvaiheisiin kuluu aikaa ja vähentäisikö laite työn kuormittavuutta tai kustannuksia. Kaiken kaikkiaan työn tavoitteena oli selvittää, olisiko KingFisher Flex kannattava hankinta Valion Seinäjoen aluelaboratorioon.

3 MAIDON TUOTANTO

Vuonna 2012 Suomessa oli 59 042 maatilaa, joista noin 9 800 oli lypsykarjatiloja (Matilda maataloustilastot 2013a). Suomen maitotiloilla oli vuonna 2012 yli 283 000 lypsylehmää, mikä oli noin 30 prosenttia nautaeläimien kokonaismäärästä. (Matilda maataloustilastot 2013c). Näillä lypsykarjatililla oli keskimäärin 23 lehmää, joista yhden keskimääräinen maidontuotanto oli 7500 l/vuosi (SEY, [viitattu 25.3.2013]). Suomessa kuljetetaan maitoa meijereihin 2000 miljoonaa litraa vuodessa, josta Valiolle viedään 86 % (Valio, [viitattu 25.3.2013]).

Maitotilojen määrä on Suomessa ollut jo pitkään vähenemässä, mihin ovat vaikuttaneet muun muassa väestön ikääntyminen ja tilakokojen kasvu. Alla olevassa kuviossa näkyy maitotilojen ja lypsylehmien lukumäärän väheneminen vuodesta 1995 vuoteen 2013. Kuviosta nähdään, että samalla kun tilojen määrä on vähentynyt, myös lehmien lukumäärä pienentynyt. Lehmien määrä ei kuitenkaan ole samaan tapaan romahtanut, mikä selittyy tilakokojen kasvulla. Kuvio 1 perustuu Tiken maataloustilastoihin.



Kuvio 1. Maitotilojen ja lehmien lukumäärä.

3.1 Laktaatiokausi

Hieman ennen lehmän poikimista utareessa alkaa maidontuotanto, jotta vasikalle olisi varmasti ravintoa sen synnyttyä. Maidontuotanto jatkuu noin 300 päivää poikimisen jälkeen, tätä maidontuotannon aikaa kutsutaan laktaatiokaudeksi. Jo laktaatiokauden loppuvaiheessa maidontuotanto vähenee hiljalleen ja noin 300 päivän jälkeen tuotanto on tippunut 15–25 %. Tämän vuoksi lehmä siitetään uudelleen noin parin kuukauden jälkeen poikimisesta. Maidontuotannon vähentyessä lypsäminen lopetetaan noin 60 päivää ennen poikimista, mitä kutsutaan lehmän ummessaoloajaksi. Poikimisesta alkaa uusi laktaatiokausi, joita lehmällä on normaalisti viisi. (Bylund 1995, 4.)

3.2 Lypsytapahtuma

Lypsytapahtuma alkaa esikäsitteystä, jossa pestään ja kuivataan utareet lypsyä varten. Esikäsitteilyn yhteydessä otetaan myös alkusuihkeet, joiden tarkoituksena on puhdistaa vedinkanavat ennen lypsyä. Lehmän utareiden iholla on runsaasti bakteereita, joten utareiden puhdistus on välttämätöntä maidon laadun ja lehmän terveyden kanalta. Jos vetimiä ei puhdisteta, sen pinnalla olevat bakteerit pääsevät lypsyn yhteydessä vedinkanavaan ja voivat aiheuttaa utaretulehduksen. Jokaisella eläimellä käytetään puhdasta lypsypyyhettä, jotta bakteereja ei myöskään levitetä lehmästä toiseen. Pesun yhteydessä tarkistetaan myös utareiden kunto, jolloin voidaan ennaltaehkäistä utaretulehduksia. Pesun jälkeen utareet on kuivattava, sillä sekin vaikuttaa maidon laatuun ja tulehdusten ehkäisyyn. Esikäsitteily ja pesu saavat aikaan lypsyn kannalta tärkeän maidonerittymisen. (Laitinen & Väliisaari 2003, 25–26.)

Esikäsitteilyn jälkeen seuraa varsinainen lypsy. Lypsimiä kiinnitettäessä huomioidaan niiden asento, jotta ne eivät lypsyn aikana aiheuta ilmapaineiskuja vetimiin, mikä altistaa utaretulehduksille. Lypsinten kunnosta on huolehdittava ja ne on steriloitava ennen jokaista lehmää. Rikkinäiset tai huonokuntoiset lypsimet saattavat kerätä bakteereja, jotka leviävät lehmästä toiseen. Utareterveyteen vaikuttaa paljon myös lypsytekniikka. Oikea tekniikka pienentää utaretulehduksen riskin, jolloin solutaso maidossa pysyy vähäisenä. Jokaiselle lehmälle on

sovellettava omaa lypsytekniikkaa. (Brofeldt 1991, 52.) Loppulypsyssä utareta painellaan hellästi sen tyhjentämiseksi, samalla on huomioitava, että kone irrotetaan juuri ennen maidon virtauksen loppumista. Jos utareen neljännekset ovat terveitä, maidon jääminen utareeseen ei haittaa, mutta sen sijaan tyhjälypsy voi vahingoittaa vetimiä imapaineiskuilla. (Laitinen & Välisaari 2003, 28 - 31)

Kun lehmät on lypsetty, koko lypsylaitteisto pestään huolellisesti. Pesutulokseen vaikuttavat käytetty vesi, pesu- eli vaikutusaika, veden lämpötila, pesuaine ja mekaaninen puhdistus. Tämän vuoksi lypsylaitteiston pesuun käytetään pesuaineiden ja kuuman veden lisäksi myös hankausta esimerkiksi pesusienillä ja lypsyputket pestään putkipallojen avulla. Lopuksi pesuaineet huuhdellaan pois, jotta biofilmejä ei pääse muodostumaan. Näin varmistetaan laitteiston puhtaus ja maidon laadun ylläpitäminen. Oikein ja hygienisesti toimimalla vältetään levittämästä bakteereja navetassa eläimestä toiseen ja altistamasta utareita tulehduksille. Maidon laadun varmistamiseksi myös kuljetuksen aikana, maidon on jäädyttävä alle +4 °C ennen maidon noutoa. Tilatankin tyhjäämisen jälkeen on huolehdittava tankin pesusta ennen seuraavaa lypsyä. Taulukossa 1 on kuvattu maidosta jäävän lian koostumus ja sen puhdistaminen. (Laitinen 1991, 85.)

Taulukko 1. Lian koostumus ja puhdistaminen.

Lika	Liukoisuus	Poistaminen
sokeri	vesi	helppo
rasva	emäkseen	vaikea
proteiini	emäkseen, osin happoon	vaikea
mineraalit	vaihtelevasti veteen, monet suolot happoon	vaihtelee

3.3 Maidolle tehtävistä tarkastuksista

Terveessä maidossa ei ole bakteereja, jolloin bakteerit ovat peräisin vetimistä, utareen vedinkanavista ja pinnoilta, lypsäjästä, lypsylaitteista, tankista tai ilmasta (Laitinen 1991, 83). Bakteerien lisääntyminen riippuu muun muassa maidon säilytyslämpötilasta, minkä vuoksi säilytyslämpötiloja valvotaan tarkasti. Meijerissä maidon vastaanotossa jokaisesta saapuvasta erästä tarkistetaan maidon lämpötila

(alle +6 °C), aistinvarainen laatu ja antibioottijäämät. (Hakala 2004, 35 & 41). ”Maidonlaadulla tarkoitetaan kaikkia niitä raaka-maidon ominaisuuksia, joilla on vaikutusta maitotuotteiden valmistusprosesseihin, ravintosisältöön ja laatuun.” Tuottajamaidon tärkeimpiä laatuominaisuuksia seurataan säännöllisesti analyysillä, joista on koottu taulukko 2. Tuottajan maidosta saatava hinta määräytyy bakteerien kokonaispesäkemäärän ja solupitoisuuden mukaan. (Brofeldt 1991, 4.)

Taulukko 2. Tuottajamaidosta tehtävät tarkastukset. (Rajala 1993, 68-69.)

määritys/tutkimus	toisto	raja-arvot
rasva- ja valkuaisaine	kahdesti kuukaudessa	poikkeama noin alle 0,5 %
bakteerien pesäkemäärä		alle 500 000 pmy/ml
solupitoisuus		alle 750 000 pmy/ml
antibiootti	neljästi vuodessa	alle 0,004 µg eli negatiivinen
vesilisäys	kerran vuodessa	alle -0,520 °C

Taulukossa 2 on esitetty kunkin määrityksen raja-arvot joiden mukaan maito on vielä elintarvikkeeksi kelpaavaa. Kelpoisuuteen eivät varsinaisesti vaikuta rasva- ja valkuaisneiden pitoisuus tai vesilisäys, mutta ne vaikuttavat maidon laatuun ja jalostukseen, minkä vuoksi myös niitä tarkkaillaan. Maidon rasvapitoisuus vaihtelee normaalisti noin 30–50 g/l välillä (Kaartinen 1993, 22).

4 UTARETULEHDUS ELI MASTIITTI

Utaretulehdus on yleisimpiä sairauksia, jota tavataan lypsylehmillä. Se on sairauksista myös hoidetuin, sillä menetetyistä maidosta aiheutuu tilanomistajille taloudellisia tappioita. Utaretulehdus syntyy kun ympäristössä tai iholla olevat bakteerit pääsevät esimerkiksi utareen vaurion kautta vedinkanavaan ja siten utareen sisälle. Kun puolustusmekanismit eivät pysty tuhoamaan bakteereja, ne aiheuttavat utaretulehduksen eli mastiitin. Eniten utaretulehduksia esiintyy juuri poikineilla lehmillä, koska silloin lehmän vastustuskyky on heikoimmillaan. (Laitinen & välisaari 2003, 11–12.)

Utaretulehdus laskee maidon tuotannon määrää ja maidon laatua, mikä aiheuttaa tuottajalle rahallisia tappioita (Korhonen & Kaartinen 1993, 89). Tuotannon alenemisen suuruus riippuu aiheuttajabakteerista, tulehduksen vakavuudesta ja lehmästä. Alla olevassa taulukossa 3 on laskettu, kuinka paljon menetyksiä äkillinen utaretulehdus tuottajalle aiheuttaa. Menetykset on laskettu vuoden 2012 joulukuun maidon tuottajahinnalla, joka oli 42,99 snt/l (Matilda maataloustilastot 2013b).

Taulukko 3. Menetykset äkillisestä utaretulehduksesta. (Brofeldt 1991, 8.)

Menetykset äkillisestä utaretulehduksesta

maito käyttökelvotonta (pv)	7
lehmä lypsää (l/pv)	25
maidon tuottajahinta (€/l)	0,4299
menetys (€)	75,2325

heikentynyt maidontuotanto (pv)	14
lehmä lypsää (l/pv)	25
tuotannon heikentymä 30 %	0,3
maidon tuottajahinta (€/l)	0,4299
menetys (€)	45,1395

yhteensä (€)	120,372
---------------------	----------------

Koska utaretulehdus nostaa maidon solulukua, laskuissa on arvioitu äkillisen tulehduksen tekevän maidosta käyttökelvotonta seitsemäksi päiväksi eli ajaksi,

jolloin maidon bakteerien pesäkemäärä ylittää 500 000 pmy/ml tai soluluku on suurempi kuin 1 000 000 kpl/ml. Lisäksi tulehdus heikentää maidontuotantoa 14 päiväksi. Utaretulehdus ei aina aiheuta selviä oireita lehmässä, jolloin tulehdus on piilevä. Taulukukko 4 kertoo piilevistä utaretulehduksista aiheutuvat menetykset. Piilevien tautitapausten osalta menetykset voivat olla jopa suuremmat sairastavien lehmien lukumäärästä ja hoidon aloittamisesta riippuen. Myös piilevät tautitapaukset voivat pahentua tai levitä karjassa. (Brofeldt 1991, 6-9.)

Taulukko 4. Menetykset piilevästä utaretulehduksesta. (Brofeldt 1993, 9.)

Menetykset piilevästä utaretulehduksesta

Esimerkiksi 10 lehmällä			
tulehduksen vakavuus eli solutaso	3	4	5
tuotoksen heikentyminen (kg)	1,1	1,9	2,8
tulehtuneiden neljännesten määrä	6	3	1
menetys (kg/pv)	6,6	5,7	2,8
menetys yhteensä (kg/pv)	15,1		
tuottajahinta	0,4299		
menetys (€/päivä)	6,49149		
menetys (€/kuukausi)	194,7447		
menetys (€/vuosi)	2369,394		

4.1 Mastiittinäyte

Mastiitti- eli utaretulehdusnäyte on lehmän utareesta erittyvää nestettä, limaa tai maitoa, johon on sekoittunut tulehduksen aiheuttavaa bakteeria tai sen eritettä. Näytteen ulkonäkö vaihtelee valkoisesta aina tumman ruskeaan tulehdustilanteen mukaan. Mastiitinäyte otetaan epäiltäessä utaretulehdusta, eläinlääkärin määräyksestä tai umpeenpanon yhteydessä poikimisen aikaan.

Näyte on otettava steriiliin korkilliseen muoviputkioon, jota ennen vedin desinfioidaan. Näytteenottajan on pestävä kädet ja lypsettävä alkusuihkeet, jotta näytteeseen ei pääse bakteereja ympäristöstä. Näytteet voivat olla neljänneskohtaisia, jolloin erite lypsetään suoraan putkeen, tai niin sanottuja yhteisnäytteitä kaikista lehmän vetimistä, jotka voidaan ottaa esimerkiksi tonkkaan

lypsetystä maidosta sekä tankkimaidosta otettuja suurempia kartoituksia varten. (Honkanen-Buzalski 1993, 128-129.)

4.2 Utaretulehdusbakteereja

Utaretulehdusbakteerit jaetaan kahteen ryhmään niiden leviämisen perusteella. Nämä ryhmät ovat ympäristöperäiset ja lehmästä toiseen tarttuvat. Utaretulehduksen aiheuttavia bakteereja on löydetty yli 200, mutta suurimman osan tulehduksista aiheuttavat alla luetellut bakteerit. (Blowey & Edmondson 2010, 36.)

Yleisimmät utaretulehduksen aiheuttajabakteereja ovat Staphylokokit, Streptokokit ja kolibakteerit. Lypsykauden eri vaiheet vaikuttavat mikä bakteeri aiheuttaa tulehduksen herkimmin. (Honkanen-Buzalski 1991, 63.) Utaretulehdusmaitoa ei saisi juottaa myöskään vasikoille, sillä tauti voi levitä ja piillä karjassa sitä kautta. Utaretulehdusmaito onkin syytä hävittää kaatamalla viemäriin. (Raekallio & Honkanen-Buzalski 1993, 46-48.)

4.2.1 Ympäristöperäiset bakteerit

Ympäristöperäiset bakteerit voivat tarttua ulosteesta, kuivikkeista, vedestä ja karpäsistä. Nämä ovat suurimmaksi osaksi kausiluonteisia, ympäristöoloista riippuen. (Raekallio & Honkanen-Buzalski 1993, 46-48.) Ympäristöperäiset bakteerit leviävät ummessaolon aikana, lypseyjen välisellä ajalla ja maidon takaisinvirtauksessa. Ympäristöperäisille tulehduksille alttiimpia ovat lehmät, joilla on suuri määrä klinisiä tulehduksia. (Blowey & Edmondson 2010, 37.)

Ympäristöperäisiin utaretulehdusbakteereihin luokitellaan seuraavat (Blowey & Edmondson 2010, 44–55 & 215):

- *Streptococcus uberis*: tulehtunut neljännes on usein kova ja turvonnut, joskus lehmällä esiintyy myös kuumetta. Neljänneksen maidossa näkyy isoja valkoisia kokkareita. *Str. uberis* leviää usien alustassa käytetyistä heinistä, mutta sitä esiintyy myös lehmän suussa, iholla ja kuivikkeissa.

Etenkin ummessa oleva lehmä on herkkä uberikselle (Honkanen-Buzalski 1991, 63).

- Koliformiset bakteerit: *Escherichia coli*, *Enterokokki* ja *Klebsiella* bakteereille altistavia tekijöitä ovat ympäristön kosteus, likaisuus sekä likaiset utareet ja utareen vauriot. Useinpiin koliformisiin bakteereihin eivät antibiootit tehoa, mutta krooniset tautitapaukset ovat kuitenkin erittäin harvinaisia. Koska *E.coli* esiintyy suoliston normaalissa bakteerikannassa, sen ehkäisemiseksi on tärkeintä pitää utareet ja makuupaikat puhtaina myös lypsyjen välillä. Vastapoikineet lehmät ovat herkimpiä *E.colin* aiheuttamille tulehduksille. *Klebsiella* puolestaan tarttuu maaperästä ja vedestä.
- Hiiva: Tarttuu likaisesta ja märästä makuualustasta sekä jos vetimiä ei kuivata pesun jälkeen. Hiivan aiheuttamat tulehdukset hoidetaan usein lypsämällä.
- *Araknobakteeri pyogenes* ja *Peptococcus indolicus* vaurioittavat kudosta, mikä voi aiheuttaa vetimeen kuolion tai kudosten tuhoutumisen. *A. pyogenes* voi aiheuttaa myös niin sanotun kesämastiitin, jolloin tulehtuneen vetimen erite on usein pahan hajuista. Bakteeri voi levitä likaisen ympäristön, vetimen vaurioiden tai karpästen puremien kautta.

4.2.2 Tartunnalliset bakteerit

Tartunnalliset utaretulehdukset leviävät lehmään helposti poikimisen jälkeen sekä vetimen pään vaurioista. Tartunnallisille tulehduksille herkillä lehmillä on tyypillisesti iso solupitoisuus myös normaaliolosuhteissa. (Blowey & Edmondson 2010, 37.) Tarttuvia mastiitteja aiheuttavia bakteereja esiintyy tasaisesti ympäri vuoden, sillä karjassa on usein kroonisia ja piileviä infektioita. Monet näistä bakteereista elävät lehmän utareessa ja iholla. Ne voivat levitä lypsyssä tai käsien, lypsyliinujen ja lypsien mukana. (Raekallio & Honkanen-Buzalski 1993, 45.)

Lehmästä ja neljänneksestä toiseen tarttuvia mastiitteja ovat (Blowey & Edmondson 2010, 38–44 & 215):

- *Streptococcus agalactiae* on erittäin helposti tarttuva ja leviää lehmästä toiseen usein lypsyn aikana bakteerimaidosta ja kaiken siihen koskeneen kautta. Tämän vuoksi sairastunut lehmä on eristettävä karjasta. *Str. agalactiae* nostaa maidon soluja ja on hoidettavissa antibiooteilla.
- *Staphylococcus aureus* on vaikea hoitaa ja eliminoida karjasta, koska se voi elää utareen epiteelisolussa, johon antibiootit eivät pääse vaikuttamaan. Tämän vuoksi myös solutaso voi vaihdella taudin aikana. *Staph. aureus* leviää karjassa helposti, mikä saattaa aiheuttaa maanviljelijällä stressiä etenkin, jos karjassa on paljon tartuntoja ja tankkiin tulee vähän maitoa.
- *Streptococcus dysgalactiae* selviää pitkään myös ympäristössä, vaikka useimmiten esiintyykin utareen iholla tai lehmän suussa, jolloin bakteeri voi levitä nuolemalla vetimen vaurioista. Myös kärpäset voivat levittää bakteeria. *Str. dysgalactiae* kuuluu kesämastiitteihin ja altistaa utaretta *A. pyogenekselle*.
- KNS eli koagulaasi-negatiivinen staphylokokki elää utareen iholla, vetimen päässä ja vedinkanavassa. Näytettä otettaessa on lypsettävä alkusuihkeet, koska niissä esiintyy usein KNS-bakteereita, jotka eivät välttämättä ole aiheuttaneet tulehdusta. Staphylokokit ovat ihon ja limakalvon bakteereja, ne leviävät muun muassa ihmisestä, lypsyvälineistä tai takaisinvirtauksen mukana.
- *Corynebacterium bovis* johtuu yleensä heikosta vetimen desinfioinnista ennen lypsyä ja huonosta jälkilypsystä.
- *Mykoplasma bovis* on Suomessa uusin utaretulehdusbakteereista, jota Suomessa ei ollut vielä esiintynyt ennen loppuvuotta 2012. Se on lähinnä hengitystietulehduksia aiheuttava bakteeri, mutta voi aiheuttaa myös muita oireita kuten utaretulehduksen. Tämä bakteeri altistaa muille tulehdusbakteereille, leviää helposti karjassa lypsinten mukana ja on vaikea hävittää. Suomen ensimmäinen *Mykoplasma bovis* -havainto oli Pohjois-Savossa vasikkakasvatamossa. (MT 2012, 5.) Kuukautta myöhemmin todettiin Suomen ensimmäinen mykoplasma boviksen aiheuttama utaretulehdus. Bakteerin aiheuttamat tyypilliset oireet ovat

neljänneksen voimakas turpoaminen, maidon kellertyminen, vetistyminen ja kokkaroituminen. Lopuksi maidon tulo lakkaa ja tulehdus leviää muihinkin neljänneksiin. Koska M. bovikseen ei tehoa lääkitys, sairastunut lehmä on eristettävä ja poistettava karjasta välittömästi, jotta tartunta ei leviä. (Lehtonen 2012, 11.)

4.3 Taudin ilmentyminen

Utaretulehduksessa lehmän utareiden paikallinen hiussuonien verenkierto lisääntyy, tulehdussolujen määrä lisääntyy, utareiden kudokset rappeutuvat ja sidekudosta muodostuu. Ulkoisesti utareessa voi esiintyä punotusta, turvotusta, kuumatusta ja kipua. Utaretulehduksen aikana myös utareiden toiminta huonontuu. (Sandholm 1993, 73.)

Akuuteissa tulehduksissa neljänneksen maito muuttuu heramaiseksi ja siinä on sakkaumia, maidontuotanto loppuu ja yleisoireina ovat kuumeilu sekä ruokahaluttomuus. Krooninen tulehdus puolestaan aiheuttaa yleensä vain maitomuutoksia. (Honkanen-Buzalski 1991, 66.) Krooninen utaretulehdus on tila, jossa ensitulehduksen jäkeen maito muuttuu bakteerille suotuisammaksi lisääntymisympäristöksi, minkä vuoksi tulehdus uusiutuu helposti (Korhonen & Sandholm 1993, 59).

Mastiitille altistavia tekijöitä ovat esimerkiksi liian lyhyt parsi, likaisuus, utareen pieni maavara, vedinpolkema, liian raju konelypsy tai kesähaava. Utareterveyteen vaikuttavat myös utareiden ja vedinten kunto, navetan sisäilma, parsien olosuhteet ja rakenteet sekä kuivikkeet. (Honkanen-Buzalski & Seuna 1993, 145) Yksittäisen karjan utaretulehdusongelman aiheuttaja on usein yksi bakteeri valtaosassa tulehdustapauksissa, syynä on usein leviäminen tai aiheuttajabakteerin suostuisat olosuhteet (Yli-Hynnilä 2005, 14–15).

Utaretulehduksen ennaltaehkäisy on aina tehokkaampaa ja taloudellisempaa kuin sen hoitaminen (Brofeld 1991, 11). Tautia voi ehkäistä eläinten oikealla käsittelyllä ja lypsytekniikalla sekä pitämällä huolta utare- ja lypsyhygieniasta. Myös lypsinten kunto ja rakenne vaikuttavat utareiden kuntoon. Uteretulehdusten välttämiseksi ja

levittämisen ehkäisemiseksi on huolehdittava lypsyhygieniasta ja lypsyjärjestyksestä. Lypsy aloitetaan terveistä ensikoista, joita seuraa terveet, hoidetut ja parantuneet. Lopuksi lypsetään krooniset ja akuutit tulehdustapaukset. Jokaisen lehmän välissä vaihdetaan pudas vesi ja pyyhe, jolla utareet pyyhitään. (Perttilä 1991, 59.)

Utaretulehdusta hoidetaan esimerkiksi umpeuttamalla neljännes, jonka yhteydessä voidaan lääkittää antibiooteilla tai muilla lääkeaineilla. Utaretulehduksen hoitona voidaan joissakin lievissä tulehdustapauksissa myös lypsää. Lypsettäessä vedinkanava puhdistuu bakteereista maidonvirtauksen mukana. (Maatilan Pellervo 2005, 23-25.)

Utareterveys on Suomessa huomattavasti parantunut 1990-luvulta, mihin on vaikuttanut muun muassa eläinlääkäreiden keskittyminen ennaltaehkäisevään hoitoon, myös hyvä navettapuhtaus on vähentänyt utaretulehdusten määrää. Tästä johtuen myös lääkeaineiden käyttö on vähentynyt. Suomessa ja Pohjoismaissa utaretulehdusnäytteitä tutkitaan selvästi enemmän kuin muualla EU:ssa. Valion Seinäjoen aluelaboratoriossa analysoidaan jopa yli 100 000 näytettä vuodessa. (Taipale 2011, 10.)

4.4 Maitotuotteista

Utaretulehdus aiheuttaa muutoksia maidon koostumuksessa. Se kasvattaa muun muassa verisuonten läpäisevyyttä, jolloin ioneja ja proteiineja siirtyy maitoon, mikä nostaa myös ominaisjohtokykyä. Maidossa nousevat tulehdussolujen ja entsyymien määrä sekä pH-luku. Utaretulehdus laskee maidon ominaispainoa ja tuotannon määrää. (Korhonen & Kaartinen 1993, 89–95.) Taulukossa 5 on esitettyä raakamaidon koostumus sekä utaretulehduksen aiheuttamat muutokset maitoon.

Taulukko 5. Utaretulehduksen aiheuttamat muutokset maidossa. (Bylund 1995, 2.)
(Blowey & Edmondson 2010, 3.)

**Utaretulehduksen aiheuttamat muutokset raakamaidon
koostumuksessa**

Maidon ainesosa	Osuus maidossa (%)	Utaretulehdusmaito
proteiini	3,5	vähenee hiukan
kaseiini	2,8	laskee 6-20 %
rasva	3,7	laskee 4-12 %
hiilihydraatit	4,8	laskee 5-20 %
tuhka	0,7	laskee

Huonontunut maidon laatu vaikuttaa meijereiden jalostusprosesseihin, etenkin juuston ja hapanmaitotuotteiden valmistuksessa, koska entsyymipitoisuuden kasvaminen aiheuttaa kasvuhäiriöitä valmistuksessa käytettäville hyötybakteereille (Brofeldt 1991, 10). Etenkin juuston valmistuksessa vaikuttavat kaseiinin, rasvan ja kuiva-aineiden väheneminen sattaa aiheuttaa virheikäymistä ja laatuvirheitä. Jos utaretulehdusmaitoa on päässyt prosessiin, valmiissa tuotteessa voi ilmetä maku-, haju- ja rakennevirheitä ja tuotteella on usein myös heikompi säilyvyys. (Laitinen & Välisaari 2003, 13.) Taulukossa 6 on utaretulehdusmaidon aiheuttamat haittavaikutukset eri maitovalmisteissa.

Taulukko 6. Utaretulehdusmaidon vaikutus prosessointiin. (Korhonen 1993, 311.)

maitovalmiste	haittavaikutus
raaka-maito	eltaantunut maku
patöroitu maito	heikko lämmökestävyys haju- & makuvirheet huono säilyvyys
maitojauhe	heikko lämmökestävyys haju- & makuvirheet huono säilyvyys
hapanmaitovalmisteet	huono bakteerien kasvu häiriöitä arominmuodostuksessa huono saostuman rakenne heran erottuminen
voi	pitkä kirnuamisaika huono maku & aromi hidas asetyylin muodostus nopea hapettuminen
juustot	huono hapatebakteerien kasvu hidas juoksettuminen huono saostuman lujuus huono juustosaanto hidas kypsyminen aromi- & rakennevirheitä

5 UTARETULEHDUSNÄYTTEIDEN ANALYSOINTI

Utaretulehdustapauksissa kehoitetaan aina tekemään bakteriologinen tutkimus. Halvin keino on maljaviljely, mutta se on hidas ja epätarkka menetelmä. Maljaviljely kestää 2-4 vuorokautta ja sillä ei havaita pieniä esiintymiä, mikä on tärkeää etenkin *M. bovis* tapauksissa, joissa bakteeri pyritään havaitsemaan ennen sen leviämistä epidemiaksi. (Knuutila 2010, 15.)

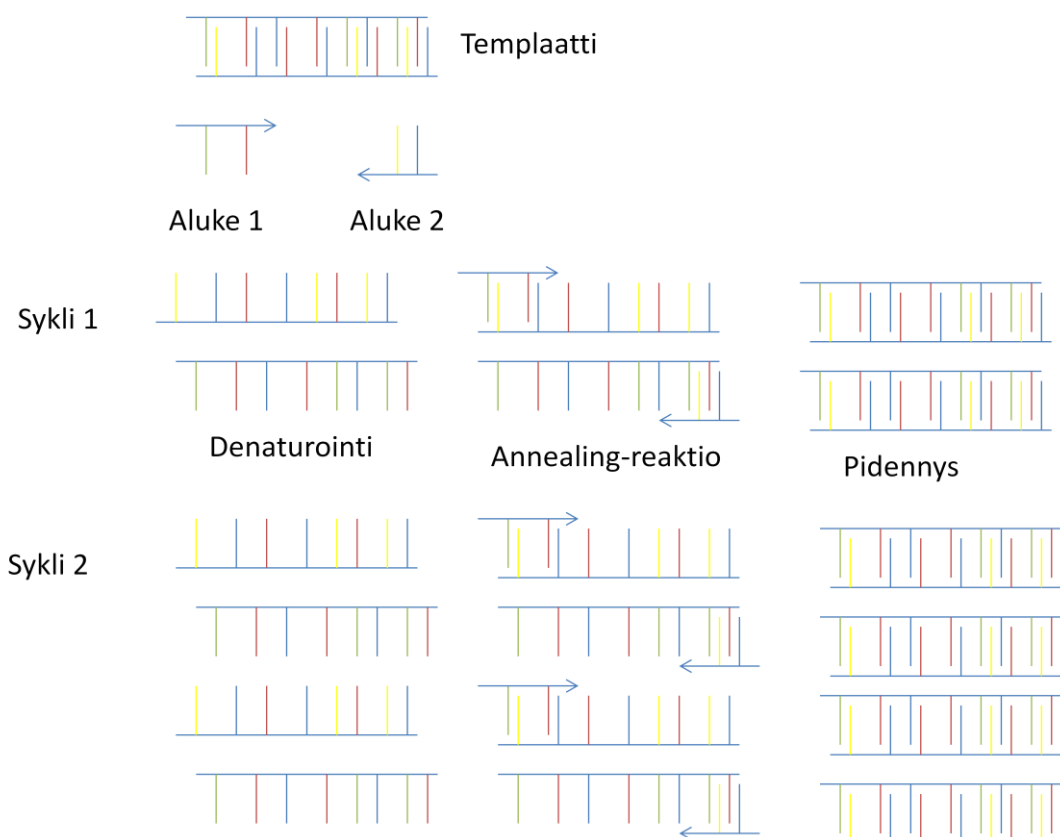
Vuonna 2009 Valion Seinäjoen aluelaboratoriossa siirryttiin maljaviljelystä PCR-tekniikkaan, johon tämäkin työ keskittyy. PCR-menetelmä on huomattavasti nopeampi, sillä tuloksen valmistuminen kestää vain muutaman tunnin. PCR-menetelmä on kalliimpi, mutta tarkempi bakteerien tunnistuksessa ja se on myös hyvin herkkä kontaminaatioille. Viljelymenetelmällä tehtäessä on suositeltu, että antibioottihoitoja ei saa aloittaa ennen tutkimusta, mutta PCR menetelmässä lääke- tai säilöntaineet eivät vaikuta bakteerien diagnosointiin (Hartikainen 2005, 21).

PCR-tekniikassa on ensin eristettävä bakteerien DNA maitonäytteistä, minkä jälkeen DNA:t monistetaan. Monistamisen avulla bakteerit havaitaan ja monistumisen nopeudesta voidaan määrittää alkuperäisen näytteen bakteeripitoisuus. PCR-tekniikalla pystytään tunnistamaan 15 yleisintä utaretulehduksen aiheuttajabakteeria sekä *KNS* ja *S. aureus* bakteerien penisilliiniresistenssi beta-lactamaasi-geeni. Beta-lactamaasigeenin avulla saadaan tietää, sopiiko tulehduksen hoitoon penisilliinipohjainen antibiootti vai ei. (Knuutila 2010, 12–15.)

5.1 PCR

PCR:ssä eli polymeraasiketjureaktiossa monistetaan kahden nukleotidijärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välissä olevia DNA-jaksoja. Usein monistettavan DNA-jakson nukleotidi järjestys tunnetaan, kuten utaretulehdusdiagnostiikassa. Monistus tapahtuu pienissä putkissa, joiden lämpötilaa PCR-laite kontrolloi tarkasti ajon aikana. PCR-menetelmässä käytetään thermostabiilia DNA-polymeraasia, joka ei inaktivoitu vielä edes 100 °C asteessa.

Korkeissa lämpötiloissa alukkeiden virheellinen kiinnittyminen on vähäistä, mutta PCR-reaktiossakin voi kuitenkin tapahtua virheitä. PCR:ssä käytetään kahta aluketta, joihin kiinnittyy haluttu monistettava jakso. Kuviossa 2 on esitetty DNA-monistamisen vaiheet. (Suominen & Ollikka 2004, 107–108.)



Kuvio 2. DNA:n monistaminen eli polymeraasiketjureaktio.

Templaatti eli kopioitava DNA-alue on usein kaksijuosteinen, joten PCR-laite denaturoi eli aukaisee juosteen ensin nostaen lämpötilan 95 °C. Tämän jälkeen lämpötila lasketaan, kunnes alukkeet voivat tattua monistettavaan juosteeseen. Tätä vaihetta kutsutaan annealing-reaktioksi, jonka jälkeen lämpötila nostetaan 72 °C:een, jotta juoste lähtee rakentumaan. Juosteen uudelleen rakentumista kutsutaan templaatin pidennysreaktioksi. Parin minuutin päästä juoste on valmis, jolloin lämpötila nostetaan jälleen 95 °C asteeseen, joka denaturoi juosteet. Sen jälkeen lämpötila lasketaan taas, jotta uuden juosteen monistus voi alkaa. Tällaista yhden denaturoinin, annealing-vaiheen ja pidennysreaktion jaksoa kutsutaan sykliksi. Yhden syklin aikana templaattien määrä tuplaantuu edellisestä

syklistä. PCR-ajossa sykliä toistetaan 40 kertaa, jolloin ajo kestää noin 1,5 tuntia. (Suominen & Ollikka 2004, 107–109.)

PCR-menetelmä on herkkä kontaminaatioille, etenkin jos templaattia on vähän, jo muutama vieras molekyyli riittää. Kontaminaatiot voivat olla peräisin esimerkiksi ilmasta edellisten reaktioiden jälkeen, jos näytteitä ajettu toistuvasti. Kun kontaminantti monistuu, syntyy virheellisiä tuloksia. Väärä positiivinen tulos saattaa aiheuttaa kalliita ja tarpeettomia jatkotutkimuksia sekä hoitoja. Tämän vuoksi PCR-eristystila voidaan ylipaineistaa, jotta kontaminantteja ei pääse muista tiloista. Myös PCR-koneet on pidettävä eri tilassa kuin missä eristys tapahtuu, koska ajossa putkiin muodostuu aerosoleja, jotka voivat auetessaan levitä ilmaan. (Suominen & Ollikka 2004, 111–112.)

Kontaminaatioiden ehkäisemiseksi eristyksen työskentelyalueet on pidettävä puhtaina, joten pöydät desinfioidaan etanolilla ennen ja jälkeen työskentelyä. Eristyksessä käytetään kertakäyttöisiä kumihanskoja, jotka vaihdetaan riittävän usein, näin vältetään kosketuksen välityksellä leviäviä bakteereja. Kullekin työvaiheelle on omat pipetit, joissa käytetään suodattimellisia steriilejä pipetinkärkiä. Suodattimet ovat eristyksessä tärkeitä, koska myös pipetointivaiheissa näytteisiin kehittyy jonkin verran aerosoleja. PCR-ajoliuoksia suositellaan valmistamaan vain pieni erä kerrallaan ja ylijäämä heitetään pois kontaminaatioiden välttämiseksi. (Suominen & Ollikka 2004, 111–112.)

Kokonaisuudessaan PCR-tekniikan toimintaan liittyvät jokaisen työvaiheen välineet. Ensinnäkin välineitä ja työpisteitä pidetään puhtaina kontaminaatioiden välttämiseksi työn sujuvuuden ylläpitämiseksi. Pipetit on tarkistettava vähintään kerran viikossa ja kalibroitava kerran vuodessa tai aina kun siihen tulee tarve. PCR-laitteiden fluoresenssi-käyriä seurataan viikoittain. Fluoresenssikäyristä nähdään koska PCR-koneen lamppu on aika vaihtaa. Joskus on myös tarkistettava, että ajo-ohjelman säädöt ovat oikein. PCR-koneiden toimintaa seurataan kuitenkin joka ajossa näytteiden kasvukäyrien avulla. Tuloksista tarkkaillaan, että eristysreagenssit ovat olleet puhtaita, eivätkä ajoliuosten alukkeet ole päässeet sekoittumaan keskenään. Tuloksista tutkitaan myös, että näytteissä ei esiinny kontaminaatiota tai muita virheellisiä positiivisia tuloksia.

PCR-menetelmää voidaan hyödyntää esimerkiksi monistamaan tarkoin rajattuja plasmidialueita, sairauden dianosointiin, cDNA-kirjastot tekemiseen, koettimien valmistukseen, erilaisiin mutaatiotutkimuksiin, DNA-sekvenssointiin ja oikeuslääketieteellisiin tarkoituksiin. Menetelmistä kaupallisin on diagnostiikkaan sovelletut menetelmät, kuten utaretulehduksen aiheuttaman bakteerin määrittäminen. (Suominen & Ollikka 2004, 112–113.)

Utaretulehdustutkimuksiin tarkoitettut alukkeet on suunniteltu tunnistamaan vain tietyistä bakteereista peräisin olevia dna-alueita. PCR-menetelmällä ei siis tunnisteta kaikkia mahdollisia bakteereja vaan vain yleisimmät ja haitallisimmat. Näiden avulla saadaan selvitetyn tulehduksen aiheuttava bakteeri. (Suominen & Ollikka 2004, 110.)

5.1.1 PCR-ajolevy



Kuvio 2. PCR-ajolevyn pipetointi.

PCR-ajolevyllä on 96 kuoppaa, kuten kaikilla eristysautomaatin levyilläkin. Kutakin näytettä on kuitenkin pipetoitava PCR-levylle neljä kappaletta, sillä alukereagensseja on neljä. Tämän vuoksi täydelle 91 näytteen eristykselle tarvitsee neljä PCR-ajolevyä. Näiden lisäksi PCR-ajossa on oltava vähintään yksi eristysnolla, jolla testataan eristyksessä käytettävien reagenssien puhtaus ja aina

23 näytteen jälkeen yksi PCR-nollanäyte, joka varmistaa ajoliuosten puhtauden. PCR-nollaan voidaan laittaa myös streiloitua vettä näytteen sijasta.

PCR-liuokset ovat Giagenin tuottamia aluke- ja apuseoksia. Primereita on neljä erilaista, jotka pipetoidaan kuvion 3 mukaan. Jokainen Primer sisältää alukkeet eri bakteereille, joten ne eivät saa sekoittua keskenään tai ajo antaa virheellisiä tuloksia. Primer-pullot on numeroitu 1–4 ja niiden väri tummenee asteittain. Primer 1 on vaaleimman sinertävä ja Primer 4 on jo tumman liila. Kun ajoliuokset on pipetoitu kuoppalevyille, voidaan pipetoida eristetyt näytteet. Taulukossa 7 on kunkin Primerin sisältämiä alukkeita vastaavat bakteerit.

Taulukko 7. Alukeseosten sisältämät bakteerit.

Aluke seos	Seoksen sisältämät bakteerialukkeet			
Primer 1	Staph. aureus	Enterokokki	C. bovis	M. bovis
Primer 2	β -geeni	E. coli	Str. dysgalactiae	Mycoplasma sp.
Primer 3	KNS	Str. agalactiae	Str. uberis	Prototehca
Primer 4	Klebsiella	S. marcescens	A.pyogenes	Hiiva

5.2 Utaretulehdusnäytteiden eristäminen

Ennen PCR-ajoa utaretulehdusnäytteistä on eristettävä bakteerien DNA maidosta, jotta se voidaan monistaa. Bakteerit saadaan eristettyä pienistäkin näytemääristä. Utaretulehdusnäytteet ovat monimutkaisempia eristää kuin esimerkiksi sylki- tai verinäytteet. Tämä johtuu maidon valkuaisaineista eli proteiineista sekä rasvasta, sillä maidon lipideille on ominaista, että ne ovat emulgoituneina nesteessä (Mantere-Alhonen 1993, 37).

Seuraavaksi käsitellään kahden eri eristysmenetelmän työvaiheita. Ensimmäinen on Valiolla käytetty niin sanottu perinteinen paljon käsityötä vaativa bakteerin DNA:n eristäminen ja toisena on uusi KingFisher Flex -eristysautomaatin avulla toteutettu eristäminen. Näytteiden eristäminen aloitetaan järjestelemällä näytteet telineisiin. Yhteen eristykseen mahtuu enintään 91 näytettä. Alla olevassa taulukossa 8 on eristykseen tarvittavat reagenssit.

Taulukko 8. Eristysreagenssit.

Perinteinen	KingFisher Flex
AW1	AW1
AW2	AW2
AI	Tween-vesi
AE	AE
871	871
872	872
Proteinaasi K	Proteinaasi K
etanoli	etanoli
Master mix	RTL
Primer 1-4	Mag
	Master mix
	Primer 1-4

5.2.1 Utaretulehdusnäytteiden perinteinen eristäminen

Utaretulehdusnäytteiden perinteinen eristäminen vaatii paljon eri pipetointivaiheita ja näytteiden siirtelyä vesihauteen ja sentrifuugin välillä. Näytteitä mitataan mikroputkiin 350µl, DNA:n eristäminen aloitetaan näytteen puhdistamisella, jossa liuoksen avulla erotellaan solut, rasva ja epäputaudet. Solut sentrifugoidaan näyteputkien pohjalle, jotta voidaan poistaa nestefaasi. Faasi sisältää muun muassa rasvaa ja muita PCR-reaktiota häiritseviä aineita. (ThermoFisher 2012.)

Solujen joukkoon lisätään bakteerisoluja hajottava liuos pumpaamalla, jotta kiinteä faasi saataisiin liukenemaan tähän soluja pilkkovaan seokseen kunnolla. Soluja hajottava liuoksen avulla vapautetaan bakteerien DNA. Hauteen jälkeen näytteisiin lisätään proteinaasi K, joka on valkuasiaineta pilkkova entsyymi. (ThermoFisher 2012.) Molempien soluja hajottavien liuosten jälkeen näytteitä käytetään vesihauteessa. Eristyksessä olevien hauteiden tarkoituksena on nopeuttaa ja tehostaa reagenssien toimintaa säätämällä näytteiden lämpötilaa entsyymien optimitoimintalämpötilaan.

Eristyksen loppuvaiheessa DNA pestään kolmessa eri liuoksessa. Etanolin ja sentrifugoinnin avulla putkien pohjalle saostetut pelletit poistetaan ja nestemäinen osa siirretään suodatinlevylle. Perinteisellä menetelmällä DNA sidotaan

silikapohjaiseen suodatinkalvoon. Nukleiinihapot sitoutuvat suodattimeen korkeassa ionivahvuudessa, jolloin sitoutumattomat epäpuhtaudet voidaan pestä pois. Pesujen aikana DNA väkevöidään etanoliliuosten avulla. Jokaisen pesuliuoksen lisäyksen välissä näytteet sentrifugoidaan. Sentrifugoinnin aikana liukset pakotetaan suodattimien läpi vastaanottoputkiin. Pesujen jälkeen bakteerien DNA irrotetaan suodattimesta alhaisen ionivahvuuden omaavalla puskurilla näyteputkiin. Lopuksi nämä näytteet voidaan pipetoida PCR-ajolevyille. (Suominen & Ollikka 2004, 64–65.)

Useiden reagenssien lisäysten jälkeen näytteet sekoitetaan. Putket korkitetaan ja niitä ravistellaan, jotta nesteet sekoittuvat kunnolla. Sekoittamisen jälkeen ennen korkkien poistamista on aina sentrifugoitava näytteet, jotta neste valuisi putkien pohjalle eivätkä korkit avattaessa kontaminoisi näytteitä.

Keväällä 2012 Valion Seinäjoen aluelaboratorioissa korkkien kanssa oli suuria ongelmia, sillä ne eivät pysyneet kiinni hauteiden aikana. Hauteiden aikana putkiin muodostuu aerosoleja ja painetta, minkä vuoksi korkit aukeilivat. Aukeillessaan nämä aerosolit ja korkeista lentelevät pisarat kontaminoivat näytteitä. Korkkien aukeilu saattoi johtua myös huonoista korkeista tai putkista, joiden suut väsyivät korkitusten myötä, sillä ongelma paheni eristyksen edetessä.

5.3 KingFisher Flex -eritysaatomaatti

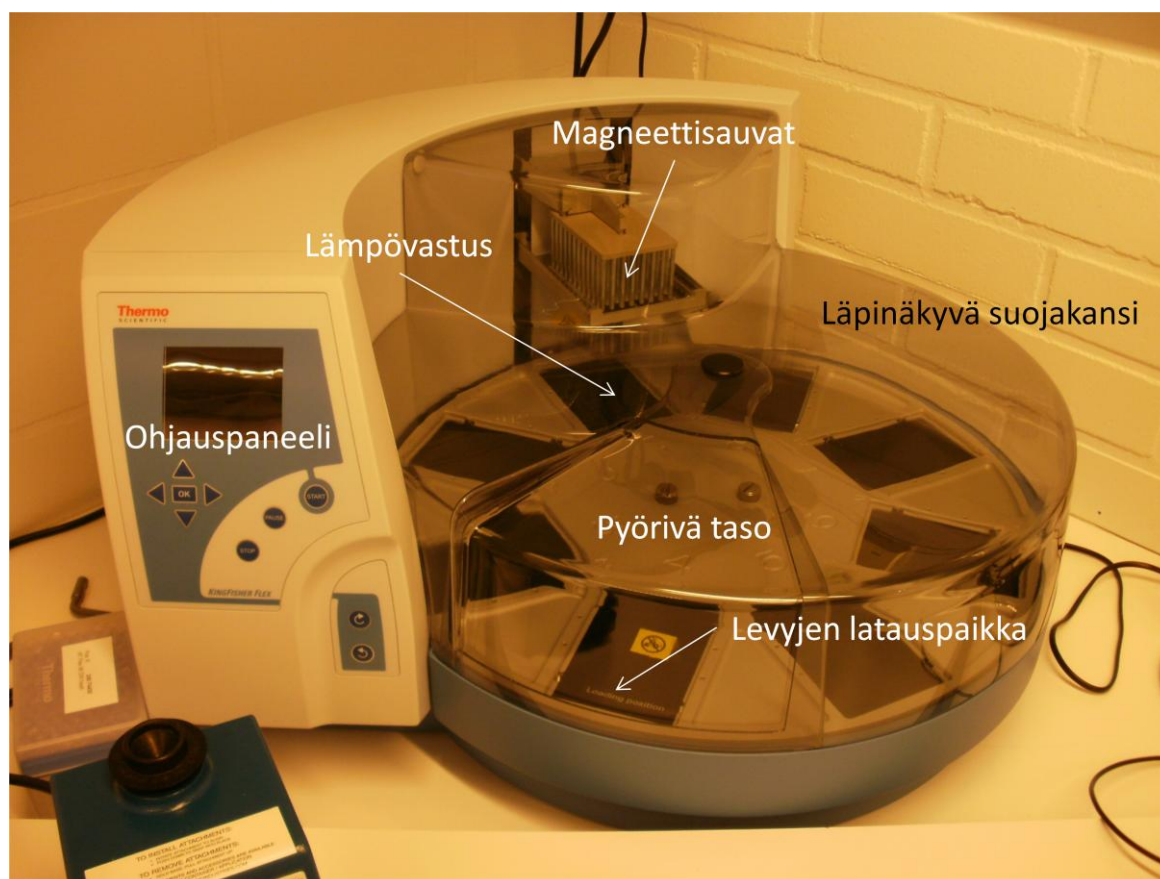
KingFisher Flex on ThermoFisherin kehittämä magneettipartikkelirobotti, joka on suunniteltu DNA:n, RNA:n ja proteiinien eristämiseen. Laitteen on tarkoitus nopeuttaa ja vähentää eristämiseen tarvittavaa työmäärää. Laitetta testataan erityisesti utaretulehdusmaitonäytteillä, jotka ovat haastavia muun muassa suuren valkuaisaine- ja rasvapitoisuuden vuoksi. (Thermo Fisher 2008.)

Laite soveltuu klinisiin, biolääketieteellisiin sekä farmaseuttisiin ja rikosteknisiin tutkimuksiin. Eristysautomaatti sopii myös biomerkkien etsimiseen, ruoan, virvokkeiden ja laadun tarkkailuun sekä kasvien ja siementen laadun testaukseen. KingFisher Flexin avulla voidaan tehdä myös eläintieteellisiä diagnooseja, kuten

Valion Seinäjoen laboratoriossa toteutetaan utaretulehdusnäytteistä. (Thermo Fisher 2008.)

5.3.1 Toimintaperiaate

Kuviossa 4 on KingFisher Flex -eristysautomaatti. Laitteessa on pyörivä taso, johon pesulevyt ja näytelevyt asetellaan ja lämpövastus, joka inkuboi näytteitä entsyymeille sopivaan lämpötilaan. KingFisher Flex on mahdollista yhdistää tietokoneeseen, jolloin voidaan seurata inkubaatioiden lämpötilamuutoksia ja laitteen toiminnan vaiheita, joilloin voidaan selvittää esimerkiksi ajossa tapahtuvan vian syy.



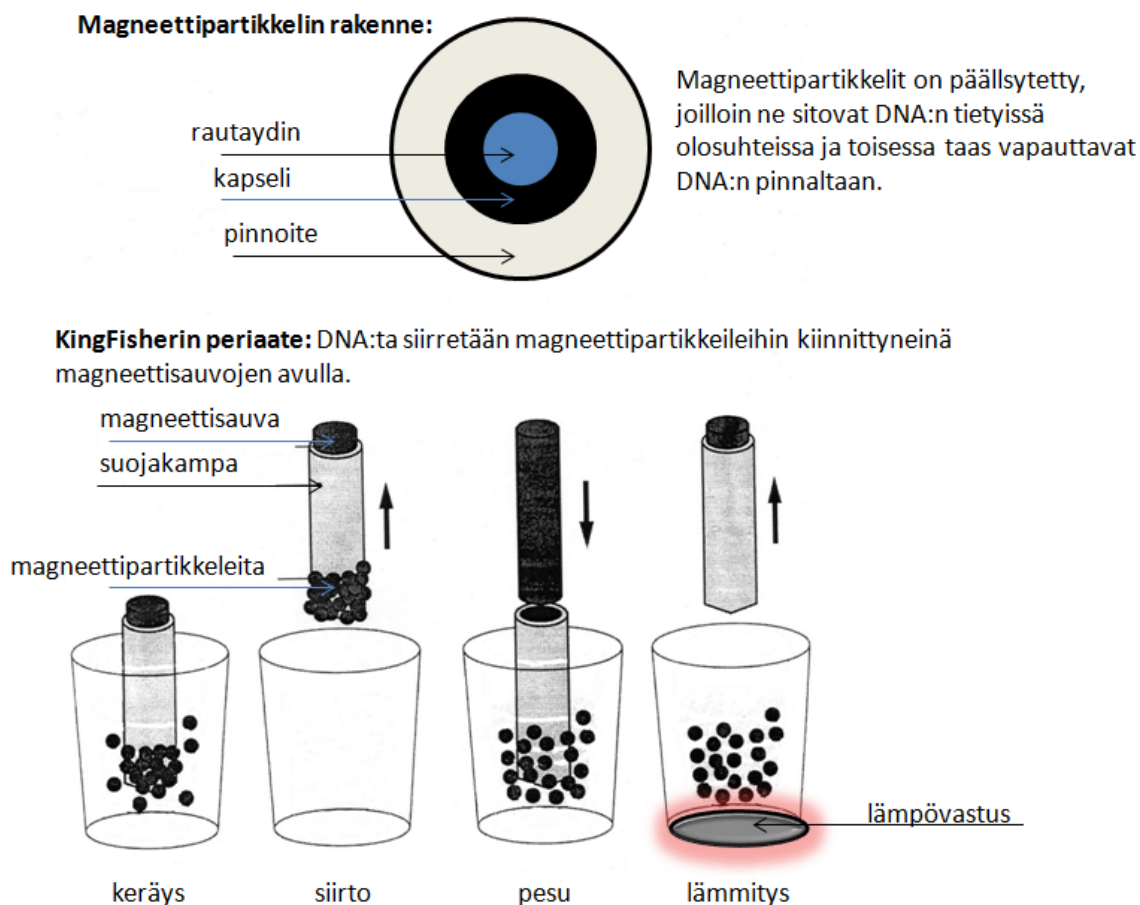
Kuvio 3. KingFisher Flex –eristysautomaatti.

KingFisher Flex -eristysautomaatissa on läpinäkyvä suojakansi, jotta käyttäjä voi valvoa ja seurata automaatin toimintakuntoa, muutoksia laitteen toimintaäänessä,

suojakamman poimintaa tai muita havaittavia muutoksia. Suojakannen tarkoituksena on ehkäistä näytteiden kontaminoitumista, vaikka laitteen vieressä työskenneltäisiin. Kansi myös estää käyttäjää laittamasta tavaroita tai käsiään väärään paikkaan, mikä suojaa konetta ja sen käyttäjää etenkin laitteen ollessa toiminnassa.

Laitteen toiminta perustuu pääasiassa sen magneettisauvoihin. Magneettisauvojen avulla suoritetaan näytteiden sekoittamiset ja DNA:n pesut ja siirtämiset pesulevyillä. Eristyksen loppuvaiheessa lisättävän magneettiseoksen avulla tapahtuu varsinainen DNA:n sitominen partikkeleiden ympärille, jolloin magneettien on mahdollista siirtää DNA:t pesuihin. Automaatti eliminoi nesteiden käsittelyä, mikä vähentää näytteiden ristikontaminaatioita, reagenssien sekoittumista ja tapaturmavaaroja. Magneettisauvat suojataan suojakammalla, jotta sauvoja ei tarvitse irrottaa ja pestä.

DNA:n siirtämiseen levyltä toiselle KingFisher Flex käyttää magneettia. Eristyksen puolivälissä näytteiden joukkoon lisätään magneettipartikkeleita sisältävä seos. Magneettipartikkeleiden tarkoituksena on kerätä irronnut DNA-aines partikkeleiden ympärille, jonka jälkeen magneettisauvat keräävät partikkelit sauvan pinnalle. Sauvojen avulla DNA siirretään pesuliuoksiin, joissa partikkelit vapautuvat pesun ajaksi. Pesuliuoksien tarkoituksena on puhdistaa DNA epäpuhtauksista, kuten solurakenteista, valkuaisaineista ja rasvasta. Pesun edetessä eluutiolle AE-liuos irrottaa DNA:n magneettipartikkeleiden pinnasta, jonka jälkeen magneettisauvat keräävät partikkelit pois ja nesteeseen jää vain puhdistettu DNA. Kuviossa 5 on esitetty magneettien toimintaperiaate. (Thermo Fisher 2010.)



Kuvio 4. Magneettipartikkelien rakenne ja KingFisherin periaate.

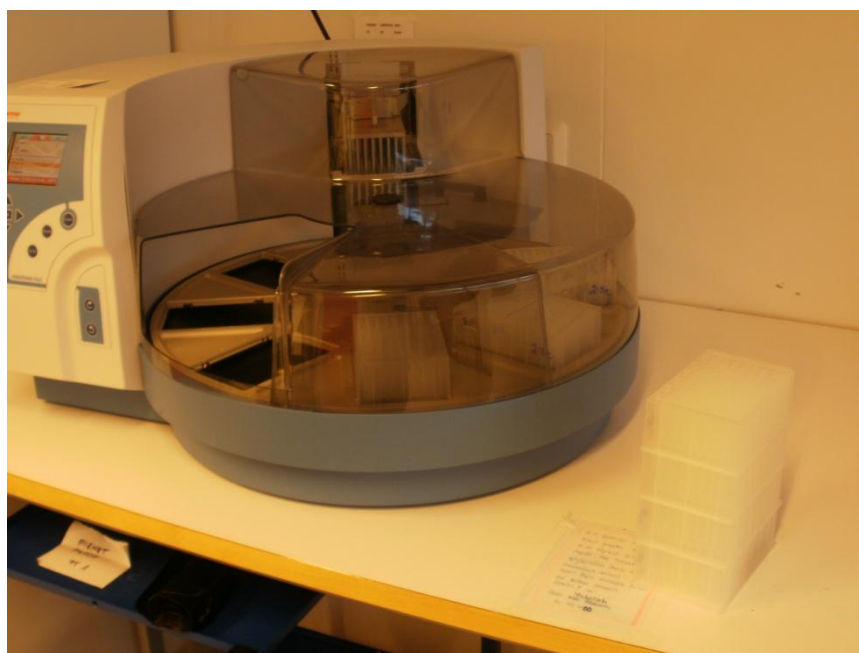
Laitteen tarkoituksena on vähentää työmäärää DNA-näytteiden eristyksessä. Automaatti suorittaa eristyksessä näytteiden sekoittamisen, sopivan reaktiolämpötilan ja siirrot pesulevyltä toiselle. Näytteiden lämmittäminen tapahtuu lämpövastuksen avulla ja sekoittaminen sekä siirrot magneettisauvoilla, jotka suojataan joka eristykseen puhtaalla muovikammalla, jottei koneen osia tarvitse puhdistaa.

5.3.2 Utaretulehdusnäytteen eristäminen automaattilla

KingFisher Flex -eristysmenetelmässä eristäminen aloitetaan samoin kuin perinteisellä menetelmällä näytteiden puhdistuksesta, jota seuraa sentrifugointi ja epäpuhtauksien poistaminen. Näytteiden määrä on kuitenkin hieman suurempi, 400µl. Suuremmalla näytemäärällä saadaan enemmän bakteereja eristykseen, minkä pitäisi vaikuttaa myös pienempien esiintymien havaitsemiseen.

Automaatilla eristettäessä bakteerisoluja hajottavan liuoksen lisäämisen yhteydessä näytteet siirretään näyteputkista kuoppalevyille. Tätä näytelevyä kutsutaan lysaatiksi. Näytteiden sakat on liuotettava, jotta näytteiden siirto on helpompaa. Seoksen homogenisoinnilla myös ehkäistään näytteiden joutumista uusintaan.

Kun KingFisher Flex -eristysautomaatti käynnistetään, koneen ohjauspaneelistä valitaan utaretulehdusnäytteille sovellettu eristysohjelma. Ohjelma alkaa koneen täytöllä, jolloin lysaatti, valmiiksi pipetoidut pesulevyt ja magneettien suojakampa asetetaan koneeseen sen haluamassa järjestyksessä. Pesulevyt voidaan pipetoida eristyksen alussa tai valmiiksi esimerkiksi kerran viikossa. Kuviossa 6 on levyjen lastausvaihe.



Kuvio 5. KingFisher Flexin täyttövaihe.

Automaatin täyttämisen jälkeen laite hoitaa näytteiden lämmitämisen, sekoittamisen ja siirrot pesulevyltä toiselle ja työntekijä hoitaa vain kahden reagenssin lisäyksen. Koska automaatti lämmittää näytteet lämpövastuksella, ovat hauteet kuumempia ja tehokkaampia kuin perinteisellä menetelmällä. Kone suorittaa ohjelmaa noin yhdeksän minuutin ajan, jonka jälkeen lyaatille lisätään proteinaasi K. Laite lämmittää ja sekoittaa näytteitä noin 11 minuuttia, kunnes se vaatii lisättäväksi magneettiseosta. Magneettiseos valmistetaan etanolista, RTL-puskurista sekä MagAttract-magneettipartikkeliliuoksesta taulukon 9 mukaisesti näytemäärästä riippuen. Menetelmässä tarvitaan sentrifuugia vain kerran, sillä suodattimen sijasta DNA sidotaan magneettipartikeliin, jolloin automaatti suorittaa pesuvaiheet, jotka vievät noin 27 minuuttia. Tämän jälkeen näytteet voidaan pipetoida PCR- ajolevylle.

Taulukko 9. KingFisher Flex -erisyksen ReM-seoksen valmistus.

1 levy

Lisättävä aine	
buffer RTL	6400 µl
etanoli	6400 µl
MagAttract	1280 µl

2 levyä

Lisättävä aine	
buffer RTL	11000 µl
etanoli	11000 µl
MagAttract	2200 µl

3 levyä

Lisättävä aine	
buffer RTL	15600 µl
etanoli	15600 µl
MagAttract	3120 µl

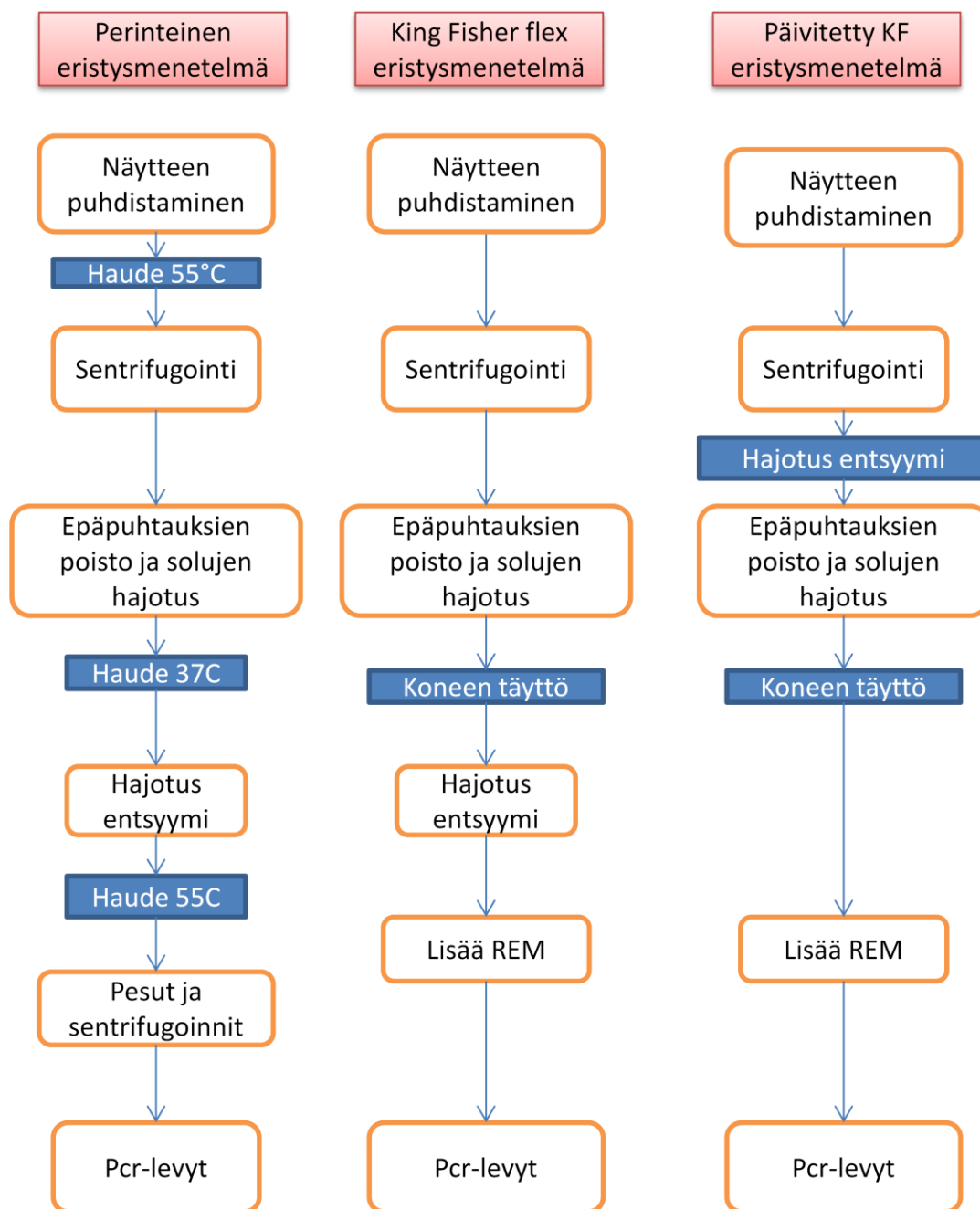
4 levyä

Lisättävä aine	
buffer RTL	20200 µl
etanoli	20200 µl
MagAttract	4040 µl

5.3.3 Eritysmenetelmän kehittyminen

PCR-menetelmä on hyvin kaupallistettu ja sen vuoksi myös kehittyvä. DNA:n eristäminen PCR-ajoa varten on ollut paljon käsityötä vaativaa. Perinteisen menetelmän rinnalle on tullut KingFisher Flex eristysautomaatti. Koska menetelmä on varsin tuore, beta-testauksen jälkeen on automaatin ohjelmistoon tehtykin

muutoksia. Muutoksien tarkoituksena on helpottaa eristysmenetelmien työvaiheita. Seuraavassa kuviossa 7 on molempien menetelmien vaiheet kuvattu lohkokaaviona, KingFisheristä on vertailuna myös päivitetty eristysmalli.

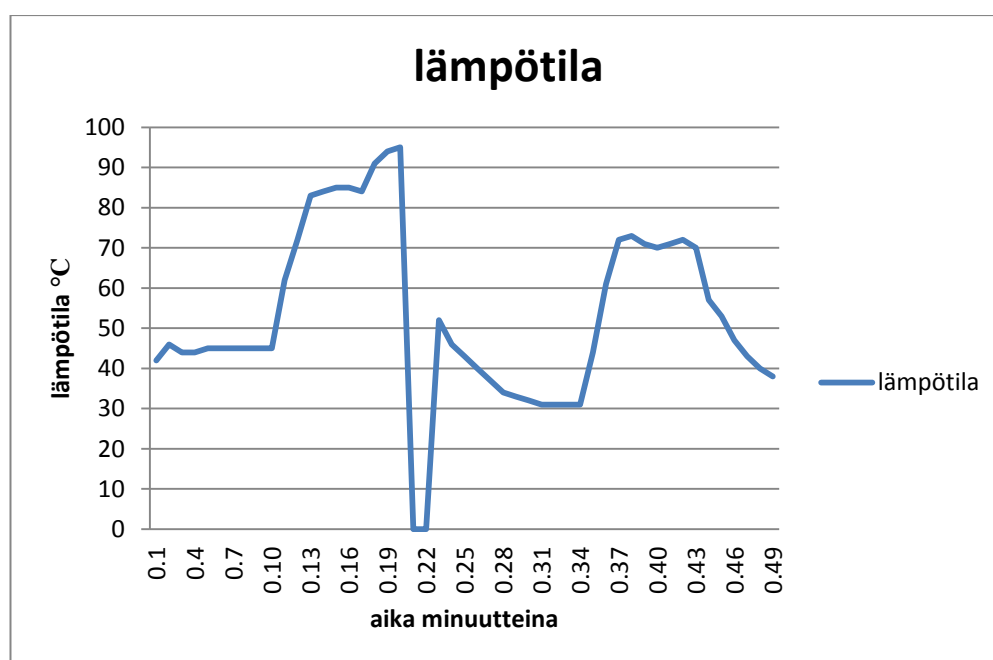


Kuvio 6. Eristysmenetelmien lohkokaaviot.

Kuviosta nähdään selvästi, että KingFisherillä eristettäessä ei tarvitse huolehtia hauteista tai pesuista. Ohjelmistopäivityksen yhteydessä automaatin menetelmässä proteinaasi K-entsyymi voidaan pipetoida näytelevylle jo ennen

näytteitä. Näin tehtäessä proteinaasin pipetointi helpottuu ja eristykseen tarvitsee lisätä myöhemmin vain magnettipartikkeliliuos, mikä sitoo työntekijää entistä vähemmän automaatin toimiessa.

Kuviossa 8 on esitetty KingFisher flexin eristuksen lämpötilakaavio. Automaatilla eristettäessä näytteet ovat koneessa lähes koko ajan yli 40 °C:n lämpötilassa. Noin 20 minuutin kohdalla tapahtuu proteinaasi K:n lisäys, minkä vuoksi siinä kohdassa lämpötilaa ei ole määritetty. Kuvion eristuksen lämpötilat ovat päivitetystä automaattieristyksestä, minkä vuoksi käyrässä havaittavissa vain yksi reagenssin lisäys.

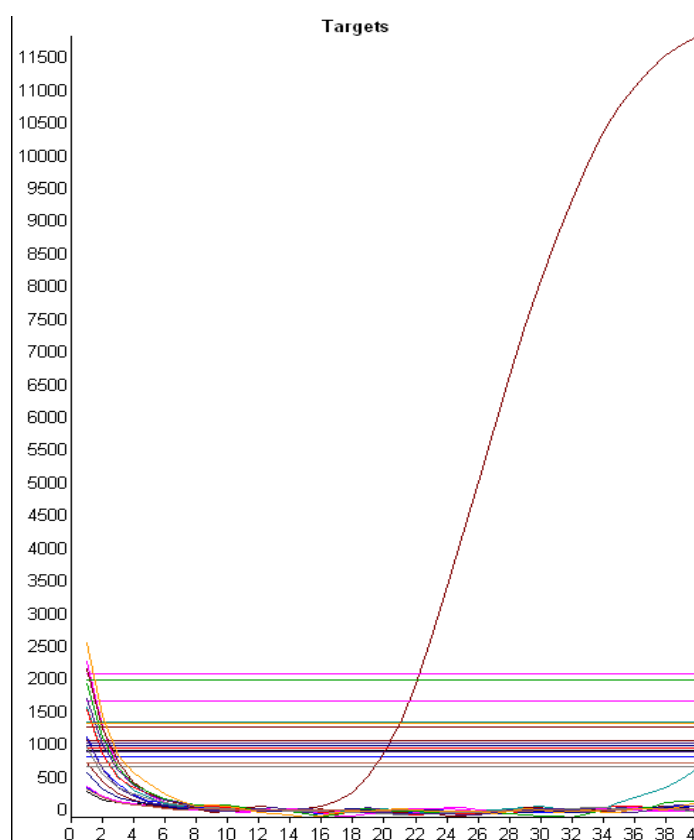


Kuvio 7. KingFisher Flexin päivitetysteristuksen lämpötilakäyrä.

6 TULOKSET

Tuloksissa on tarkasteltu kahdella eri menetelmällä saatuja utaretulehdustaudinaiheuttajabakteerien DNA-eristysten tuloksia. Beta-testauksen kannalta oleellisinta oli, että samoista näytteistä löytyisi samat bakteerit yhtä suurella voimakkuudella. Bakteerien voimakkuutta on tutkittu sekä ct-arvojen, että niiden perusteella määrytyvien plus-arvojen mukaan. Varsinaisten eristystulosten lisäksi tutkittiin eristysmenetelmiin kuluva aikaa kokonaisuudessaan ja eri työvaiheisiin jaoteltuna. Näiden lisäksi on laskettu menetelmien kesken niiden tarvikkeiden ja reagenssien minimikulutusta.

PCR-ajojen tuloksena bakteerit saavat arvon, jonka yksikkönä on Ct. Ct tarkoittaa sykliä, jonka aikana näytteen fluoresenssi eli kasvukäyrä ylittää valitun kynnysarvon. Kullakin bakteerilla on omat kynnysarvonsa, jotka ovat kuitenkin suurempia kuin taustan fluoresenssi. Ct-arvo voidaan havaita kuviosta 9 kohtana, jossa signaali alkaa nousta eksponentiaalisesti. (Palva 2007, 17.)



Kuvio 8. Bakteerin PCR-ajon kasvukäyrä.

6.1 Tulosten tulkitseminen

PCR-ajon tulokset tulkitaan Norden Lab Mastitis Studio -ohjelman avulla. Ohjelmaan haetaan tallennettu ajo, jonka jälkeen levystä saadaan esille kuvion 10 näköinen ikkuna. Ikkunassa vesemman reunan numerosarjat ovat näytteiden juoksevat numeroinnit eli näytetunnisteet. Kuvion 10 taulukon x-sarakkeen muodostavat diagnosoitavat bakteerit.

7.2.13 levy 13b

Run: 7.2.13 levy 13b
 Date: 7.2.2013 19:25:14
 Instrument: Valio 4 complete 16
 Calibration: 10.7.2012 17:14:05

Show all samples
 PCR negative
 Extraction negative
 Report
 Plate

Sample	C. b...	M. ...	Ent...	Sta...	Str...	My...	E. c...	Bet...	Str...	Pro...	Str...	Sta...	A. p...	Yea...	S. ...	Kle...
8041310835	+															
8041310836																
8041310837								+				+				
8041310838					+											
8041310839					+											
8041310840								+				+				
8041310841									+							
8041310842	+															
8041310843	+									+		+				
8041310844								+						+		
8041310845								+				+		+		
8041310846										+		+				
8041310847										+						
8041310848	+		+									+		+		
8041310849				+								+				
8041310850									+							
8041310851	+								+							
8041310852	+															
8041310853					+											
8041310854	+				+											
8041310855	+										+					
8041310856	+											+				
8041310857	+											+				

Kuvio 9. PCR-ajon levykohtainen tulostaulu.

Ikkunan merkinnät tulkitaan seuraavasti:

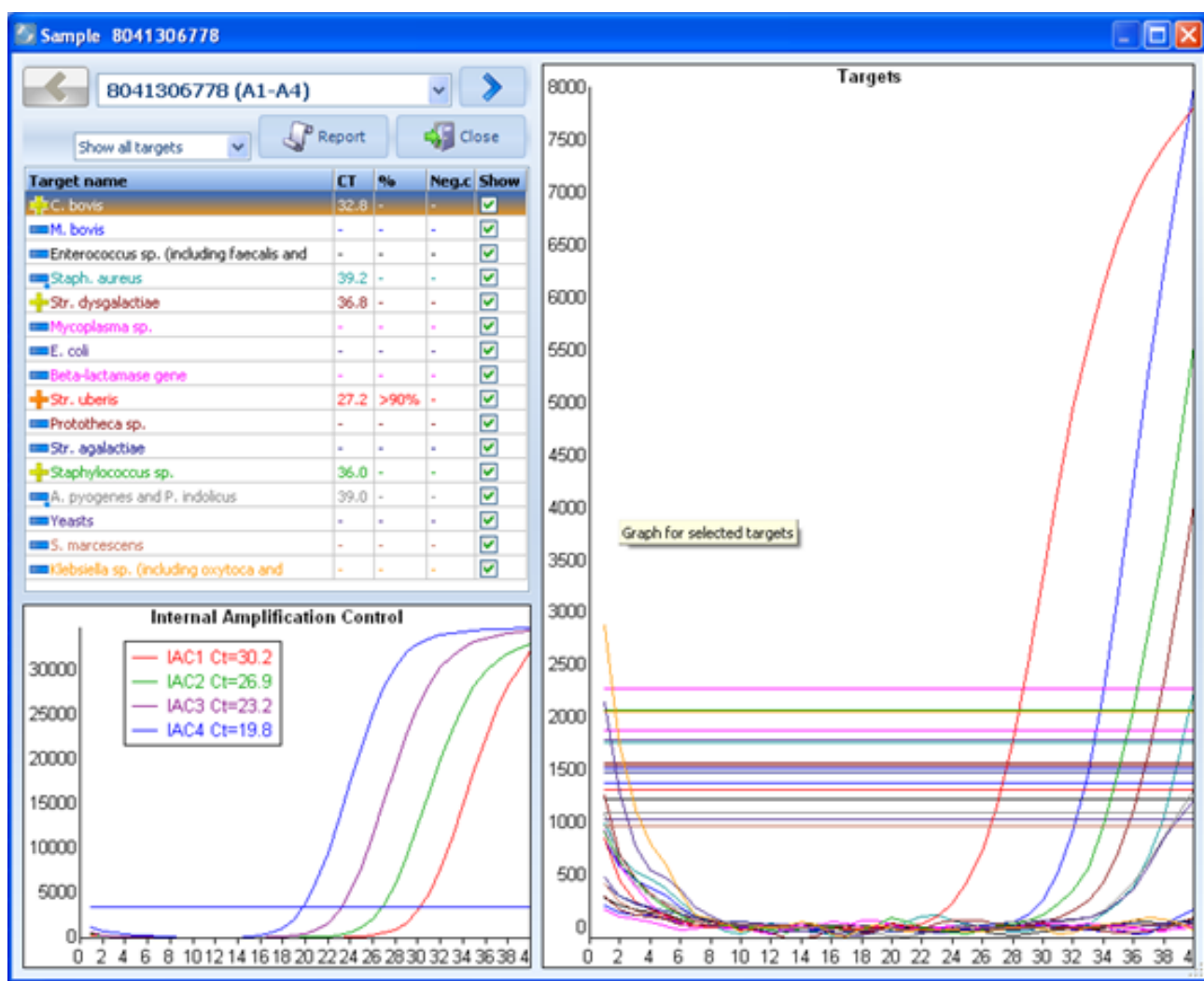
- sininen miinus – ei kasvua
- sininen miinus ja pisara – kasvua välillä 37 - 40 ct
- vihreä plus – kasvu +
- oranssi plus – kasvu ++
- punainen plus – kasvu +++
- harmaa pohja – bakteeria yli >90 %
- musta pohja – bakteeria yli>99 %

Kuvion 10 levyn ensimmäisessä näytteessä, joka on valinnan vuoksi orannssilla pohjalla, kasvuna on C.bovis-bakteeri yhdellä plussalla, eli lievä kasvu. Mikäli bakteerin kasvu on yli 37ct, se luokitellaan negatiiviseksi. Mitä pienempi ct-arvo bakteerilla on, sitä voimakkaammin sen määrä on kasvanut ja sitä vakavampi on lehmän tulehdus. Plus-arvojen tasot vaihtelevat bakteereittain seuraavan taulukon 10 Ct-arvojen mukaan. Myös plussien määrä kuvaa bakteerien määrää näytteessä ja näin tulehduksen voimakkuutta. Rajat ovat hieman erilaisia eri bakteereilla niiden aiheuttaman tulehduksen ärhäkkyyden mukaan. Tuottajat ja eläinlääkärit käyttävät ainoastaan näitä plus-arvoja tulehduksen vakavuuden arvioimiseksi.

Taulukko 10. Utaretulehdusbakteerien Ct-arvorajat.

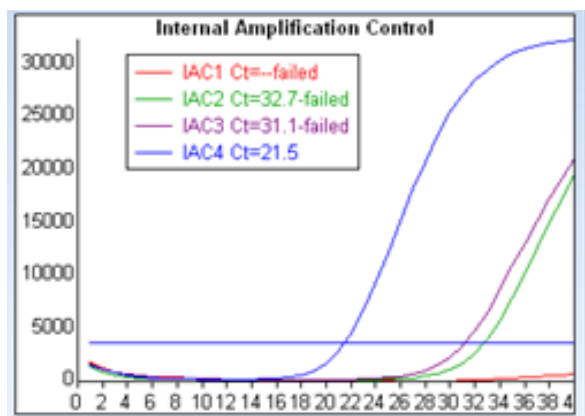
Bakteeri	Voimakkaus (Ct)		
	+++	++	+
Staph. aureus	<24	24-30	30-37
KNS	<25	24-31	31-37
β-geeni	<26	25-30	30-37
Mycoplasma sp	<27	20-30	30-37
C. bovis	<28	22-28	28-37
M. bovis	<29	22-32	32-37
Enterokokki	<30	24-28	28-37
E. coli	<32	24-34	34-37
Str. dysgalactiae	<31	22-30	30-37
Str. uberis	<33	21-31	31-37
Str. agalactiae	<34	24-32	32-37
Klebsiella	<35	24-32	32-37
S. marcescens	<36	31-34	34-37
Prototheca	<37	21-31	31-37
Hiiva	<38	22-32	32-37
A. pyogenes & P. indolicus	<39	24-30	30-37

Levykohtaisen tulostaulun lisäksi Mastitis Studio -ohjelmasta saadaan erikseen esille jokaisesta näytteestä bakteerien kasvukäyrät. Kuviossa 11 on erään näytteen tulokset. Kentässä vasemmalla ylhäällä on näytetunniste, jonka alapuolella on luettelossa bakteerit ja niiden ct-arvot näytteessä. Vasemmassa alareunassa puolestaan ovat näytteen sisäisten kontrollien käyrät, jotka kuvaavat neljän alukeseosan kasvua. Oikella kuviossa ovat näytteen bakteerien kasvukäyrät, joiden mukaan määräytyvät bakteerien ct-arvot.



Kuvio 10. PCR-ajon näytekohtainen tulokset.

Kaikkien käyrien ihannemuoto on loivan S-kirjaimen mukainen kaari, kuten kuviossa 11 nähdään sisäisillä kontrolleilla ja Str. uberiksen punaisella kasvukäyrällä. Jos sisäisten kontrollien käyrät eivät nouse vaaditulle tasolle, näyte on yleensä uusittava. Alla olevassa kuviossa 12 näkyy kontrollikäyrien riittämätön kasvu, tällöin käyrien arvoksi tulee "failed".



Kuvio 11. Näytteen sisäiset kontrollikäyrät.

IAC-fail tilanteeseen johtaa usein näytteen sisältämät PCR-inhibiittorit. Inhibiittorit häiritsevät templaattien monistumista etenkin ensimmäisessä syklissä, koska siinä on vähiten templaatteja. Mitä enemmän näytteen joukossa on häirötekijöitä, sitä herkemmin ja useamman syklin aikana templaattien monistuminen epäonnistuu. Myös hyvin suuri määrä utaretulehdus patogeenia näytteessä voi aiheuttaa vastaavan tilanteen. (Rämä 2012.)

IAC-fail-tilanteessa näyte on uusittava, koska silloin eivät myöskään näytteen bakteerit ole monistuneet normaalisti. Poikkeuksena tähän on tilanne, jossa sisäisen käyrän kasvuvirheestä huolimatta kyseisen alukeseoksen bakteereista jokin on kasvanut vahvemmin kuin 30 ct, kuten kuviossa 13.

Kuviossa 13 IAC 2 -käyrän tulos ei ole noussut riittävälle tasolle. Mutta kuten taulukosta 7 nähtiin, Primerissa 2 on Srt. dysgalactian alukkeita, joka on näytteessä kasvanut ct-arvolle 20,4 eli alle 30ct. Tällaisen tuloksen voi siis hyväksyä. Tulosten tarkastelun jälkeen tulokset siirretään Masitits Studioista LV-tietokantaan, jonka kautta tulokset hyväksytään ja lähetetään eteenpäin tuottajien tukiohjelman Valman kautta tai postitse niin tuottajille itselleen kuin heidän halutessaan myös eläinlääkäreille.

Laitteen käyttö aloitettiin perehdytyksellä ja myös eristysmenetelmä poikkeaa osittain perinteiseen verrattuna. Perehdytysajoissa oli siis tarkoitus opetella laitteen käyttöä, uusi menetelmä ja samalla seurata eri henkilöiden tulosten

eriäväisyydet. Tällä varmistetaan, että eristystekniikka on beta-testausta varten hallussa ja mahdollinen pipetoinnin käsialavaikutus olisi minimaalinen.

Perehdytyksessä kolme ihmistä eristää samat näytteet. Ensimmäisessä eristyksessä näytteitä oli kahdeksan kappaletta, jotta tutustuminen menetelmään olisi pääasiana. Eristäjinä toimivat Thermolta saapunut perehdyttävä ja kaksi Valion työntekijää. Tuloksien yhteneväisyyttä verrattiin myös alkuperäisiin, jotka olivat eristetty perinteisellä menetelmällä. Tässä ensimmäisessä erityksessä eroja oli vain kolme eri menetelmien kesken ja niidenkin merkitys oli mitätön, vain 0,4 ct:n verran, eli erot olivat hyvin pieniä.

Toisena päivänä eristivät vain perehdytettävät kaksi henkilöä ja näytemäärä kasvatettiin 22:een eli yhteen levyyn. Eroavaisuuksia oli havaittavissa etenkin alkuperäiseen verrattuna. KingFisherillä eristettyjen näytteiden tulokset olivat keskenään yhteneväisempiä, kun taas eroja alkuperäisiin noin 20, joista yli kolmen ct-arvon oli seitsemän kappaletta. Eroja oli selvästi enemmän kuin ensimmäisellä kerralla, mikä johtuu muun muassa näytemäärän lisääntymisestä ja niiden laadusta. Tähän eristykseen oli etsitty hankalimpia näytteitä eristettäväksi, jotta menetelmän kyvyt saataisiin testattua paremmin. Hankalilla näytteillä tarkoitetaan voimakkaampikasvuisia näytteitä, jotka ovat usein myös haastavia pipetoida, niiden suuren viskoosisuuden tai kokkareisuuden vuoksi. Tällöin myös PCR-ajossa saattaa ilmetä ongelmia ja näyte joudutaan uusimaan.

Kolmantena ja viimeisenä perehdytyspäivänä näytemäärää kasvatettiin 45 näytteeseen eli kahteen levyyn. Tällöin uuden mallin eristäminen oli jo teknisesti hieman helpompaa. Tuloksista voitiin päätellä, että yhdellä levyistä oli tapahtunut kontaminaatiota, koska *A. pyogenes* oli levinnyt kuuteen näytteeseen, jota muilla levyillä ei näkynyt. Kontaminaatiota luukuun ottamatta eroja alkuperäiseen eristykseen näillä levyillä oli kummallakin 23, joista yli 3 ct:n oli viisi tulosta. Huomion herätti näyte, joka alkuperäisessä oli jouduttu uusimaan, mutta KingFisher-levyllä saatiin tulos. Tämä tukee laitevalmistajan väittämää siitä, että uudella eristysautomaatilla uusintojen määrä tulisi vähenemään.

6.3 Beta-testausajojen tulokset

Perehdytyksen jäkeen aloitettiin varsinainen Beta-testaus, jossa päämääränä oli eristää 1500 näytettä molemmilla menetelmillä ja vertailla tulosten eriävyyksiä. Molemmilla tavoilla eristettiin samat näytteet saman päivän aikana, jotta vältettiin mahdolliset ylimääräiset muuttujat laitteen testausvaiheessa. Beta-testauksen aikana tuloksia lähetettiin laitevalmistajalle viikoittain ja tarkkailtiin, koska vaadittu 1500 näytettä saadaan ajetuksi. Toisaalta jos näytteistä löytyisi useampia bakteereita KingFisherillä, voitaisiin sitä pitää jopa etuna, sillä eristysmenetelmän pitäisi pystyä eristämään bakteerit tarkemmin.

Beta-testaukseen kului noin puolitoista kuukautta, jolloin saatiin ajetuksi 1537 näytettä. Näiden näytteiden Ct-arvoja tarkasteltaessa merkittäväksi eroksi on nostettu 3 Ct:n ero. Tämä perustuu ThermoFisherin määrittämiin laimennusohjeisiin, jonka mukaan näyte laimenisi 3,3 Ct:n verran. Samaa arvoa sovelletaan myös kontaminaatiotapauksiin. Näiden tulosten tarkasteluun valittu 3 Ct:n ero on helpompi laskea. Vertailun vuoksi joissakin otannoissa on valittu määritelmäksi myös plus-arvot, jotka ovat tuottajille ja eläinlääkäreille merkittävämpi tieto. Tätä ei kuitenkaan haluttu käyttää yksistään, sillä se saattaisi vääristää tuloksia, koska tasojen Ct-arvojen välillä saattaa olla vaihtelua jopa 10 Ct:tä tai toisaalta rajatapauksien ero voi olla vain 0,1 Ct. Bakteerien Ct-arvorajat on nähtävissä aiemmin esiintyneessä taulukossa 10.

Testauksessa mukana oleiden näytteiden tulosten perusteella on koottu seuraava taulukko 11. Taulukosta nähdään eristyksien päivämäärät ja eristyksessä mukana olleiden näytteiden lukumäärä. Tuloksia vertailemalla on määritetty, kuinka monessa KingFisherillä eristetyssä näytteessä oli poikkeavuuksia alkuperäisiin näytteisiin verrattuna. Näiden eroavaisuuksien mukaan on laskettu kullekin levyille tulosten virheprosentit ja niiden vastaluvut yhteneväisyysprosentit.

Taulukko 11. Tulosten yhteneväisyys.

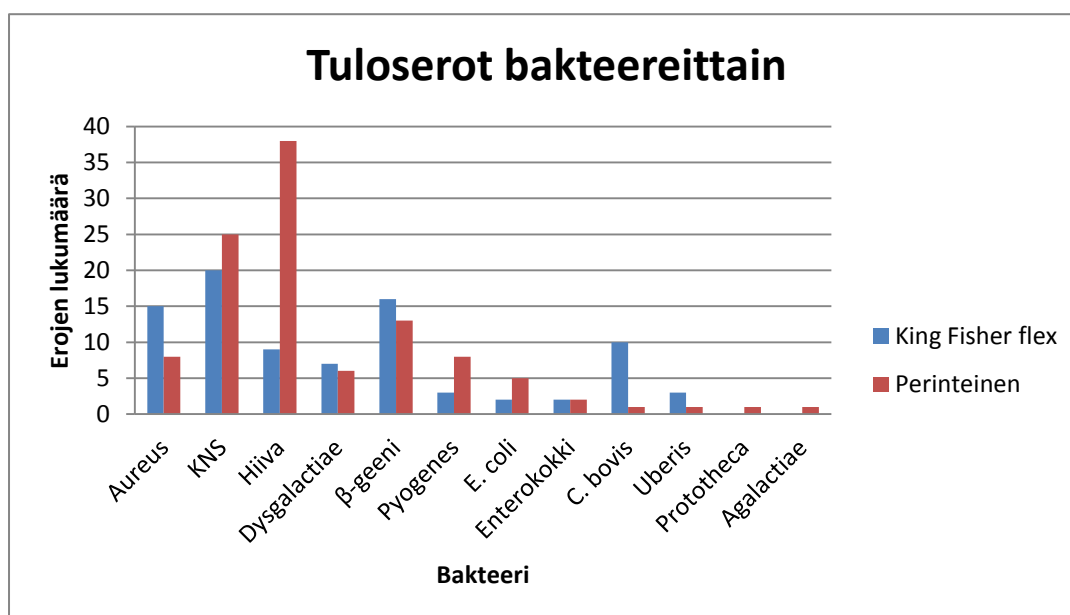
eristys	näyte määrä	eroja	virhe-%	yhteneväisyys-%
22.2.2012	8	0	0,00	100,00
23.2.2012	22	10	45,45	54,55
24.2.2012	45	7	15,56	84,44
28.2.2012	91	27	29,67	70,33
29.2.2012	91	26	28,57	71,43
1.3.2012	45	14	31,11	68,89
2.3.2012	22	10	45,45	54,55
6.3.2012	76	6	7,89	92,11
8.3.2012	91	24	26,37	73,63
9.3.2012	91	26	28,57	71,43
14.3.2012	91	23	25,27	74,73
15.3.2012	68	12	17,65	82,35
19.3.2012	68	26	38,24	61,76
20.3.2012	91	19	20,88	79,12
21.3.2012	91	30	32,97	67,03
22.3.2012	91	20	21,98	78,02
23.3.2012	91	27	29,67	70,33
2.4.2012	91	28	30,77	69,23
3.4.2012	91	19	20,88	79,12
4.4.2012	91	27	29,67	70,33
5.4.2012	91	20	21,98	78,02
yht	1537	384		
ka			27,09	73,88
ka eluutio vaihdon jälkeen				73,64
ka ennen eluution vaihtoa				74,13

Beta-testauksen aluksi eluutiona käytettiin matalaa noin 3 cm syvyistä näytelevyä. Vaikka matalalta levyltä oli erittäin helppo pipetoida näytteet PCR-levyille, eluutiolevyt vaihdettiin laitevalmistajan kehoituksesta korkeampaan pesulevyjä vastaavaan. Koska laitteen magneettisauvat käyvät eristyksen aikana näytelevyn pohjassa, se nostaa näytteiden nestepintaa, mikä mahdollistaa näytteiden ristikontaminaation. Sen vuoksi taulukossa 11 on laskettu yhteneväisyysprosenttien keskiarvo myös 14.3. eluutiolevyn muutoksesta lähtien, jotta voidaan todeta ovatko kontaminaatiot sen jälkeen vähentyneet.

Kaikkien tulosten yhteneväisyysprosentteista laskettu keskiarvo on 73,88 %. Taulukossa on laskettu myös keskiarvot ennen eluution levyn vaihtamista ja sen

jälkeen. Huomataan, että yhtenäisyys on jopa laskenut vaihdoksen jälkeen. Tämä viittaa siihen, että suurin osa eristyksen kontaminaatiosta tapahtuukin näytteiden käsittelyvaiheessa jo ennen automaattia. Eluution levyn korkeuden vaihtamisella ei näyttänyt olevan suurta vaikutusta. Keskiarvon huononemiseen vaikutti luultavasti eniten se, että testauksen loppuvaiheessa uudella menetelmällä eristämiseen oli vähemmän aikaa, jolloin saattoi tapahtua virheitä.

Pieniä eroja on kuitenkin aina, vaikka eristäjä ja menetelmä olisivat samat. Tämä johtuu esimerkiksi siitä, että etenkin KNS-bakteeri kasvaa maitonäytteessä ryppäinä, jolloin on sattumaa kunnon sekoituksesta huolimatta, kuinka paljon bakteerikantaa saadaan eristykseen mukaan. Tätä väitettä tukee myös alla oleva kuvio 14, joka on otanta tutkimuksen näytteistä. Toisaalta joillakin hyvin voimakasvaikutteisilla bakteereilla kuten *A. Pyogenes* samojen arvojen saanti on paljon todennäköisempää.



Kuvio 13. Tuloserot bakteereittain.

Kuviossa 14 erot on laskettu plus-arvojen mukaan, jossa bakteerin suurempi plus-määrä eli voimakkaampana esiintynyt bakteeri on saanut pisteen. Kuviosta nähdään, että eniten tuloserot molemmilla puolilla ovat aiheuttaneet KNS-bakteerit. Koska KNS, *S. aureus* ja β -geeni voivat aiheuttaa tulehduksen myös yhdessä, on niiden kaikkien jakautuminen näytteessä samalla tavalla epäsäännöllinen. Näiden

kolmen bakteerin lisäksi selvän eron tekee hiiva. Perinteisellä menetelmällä hiivaa on esiintynyt noin neljä kertaa enemmän kuin KingFisherillä, mikä oli yllättävää. Selvää syytä hiivaesiintymien määrään on vaikea kohdistaa. Tulosten erot eivät suurimmassa osassa tapauksissa kuitenkaan ylitä 3 ct:n eroa ja tulokset ovat yhden plussan voimakkuudella, jolloin järkevin selitys on käsistä ja ympäristöstä levinnyt kontaminaatio. Koska KingFisherillä näytteet käsittelee suurimmaksi osaksi automaatti suojakannen alla, ympäristön kontaminanttien pääseminen näytteisiin on epätodennäköisempää. Vastaavasti perinteisessä paljon käsityötä vaativassa eristyksessä tämä on paljon mahdollisempaa. Tätä teoriaa tukee se, että hiivä on yleisesti ympäristöstä leviävä taudinaiheuttaja, jota esiintyy myös ihmisten iholla. Samassa tilassa tehdyt aiemmat eristyksetkin saattavat levittää ilmaan edellisten eristysten bakteereja.

C.boviksen suurempi esiintyminen KingFisherin näytteissä saattaisi johtua laitevalmistajan väitteestä, jonka mukaan laite puhdistaa DNA:n paremmin. Paremman erottelukyvyn myötä myös pienemmät esiintymät saadaan paremmin näkyville. Toisaalta kyseessä saattaa myös olla kontaminaatio.

6.4 Kontaminaatiot

Ct-arvoja tarkasteltaessa, merkittäväksi eroksi on nostettu 3 Ct:n ero. Tämä perustuu Thermon määrittämiin laimennusohjeisiin, joiden mukaan 1:10 laimennettu näytteen uusinta arvioidaan tuloksissa 3,3ct:tä pienemmäksi eli vahvemmaksiksi. Samaa laimennus-arvoa käytetään esimerkiksi selvissä kontaminaatiotapauksissa, joissa eristysnollan ja näytteitä on todettavissa kontaminoituneen samasta bakteerista. Tällöin näytteiden tuloksista voidaan poistaa saman bakteerin kasvut, jotka ovat 3,3 Ct-arvon sisällä eristysnollan tuloksesta. Koska kontaminaatiot eivät aina tapahdu kaikkiin näytteisiin, myös E0 voi olla puhdas, vaikka eristyksessä olisikin havaittavissa selvä kontaminaatio. Sen vuoksi kontaminaatiotulosten tarkasteluun ThermoFisherillä on erilliset ohjeet, joiden mukaan epäilyttäviä tuloksia voidaan tutkia. Näiden tulosten tarkasteluun valittu 3 ct:n ero on helpompi laskea. Tämän vuoksi kuvion 14 otannassa oli valittu plussa-vertailu, mikä on tuottajille ja eläinlääkereille annettava tieto. Näissä

vertailuissa rajatapauksien ero saattaa olla vain 0,1 Ct ja toisaalta taas suurimmillaan jopa 9 Ct:tä.

Taulukko 12. Tuloksissa epäilty kontaminaatiot.

Epäilty kontaminaatiot

Näytemäärä	Perinteinen	KingFisher
8	0	0
22	1	2
45	0	6
91	3	11
91	8	3
45	4	0
22	0	0
76	1	0
91	3	0
91	1	10
91	15	1
68	0	1
68	0	0
91	0	0
91	9	28
91	0	0
91	0	3
91	10	0
91	4	1
91	11	0
91	3	1
1537	73	67

Taulukossa 12 on kunkin eristyksen näytemäärät ja molempien menetelmien näytteiden määrät, joissa on epäilty tapahtuneen kontaminaatio. Kontaminaatioiksi on epäilty tapauksia, joissa perinteisellä ja KingFisher menetelmän tuloksissa on ollut selkeitä eroja. Tällöin eristetetyltä levyltä on havaittu jokin voimakkaampikasvuinen bakteeri, joka oli levinnyt yhteen tai useampaan näytteeseen.

Taulukosta 12 nähdään, että kontaminaatioiden määrässä ei ole suurta eroa, vaikka perinteisellä menetelmällä niitä on muutama enemmän. Kontaminaatioiden määrään on vaikuttanut perinteisellä menetelmällä korkkien aukeilu. KingFisherillä

tähän on luultavasti vaikuttanut menetelmän eristämisen rutinoitumattomuus ja kiirehtiminen. Kontaminaatioiden määrä on joka tapauksessa suhteellisen pieni näytteiden kokonaismäärään nähden, joten KingFisher menetelmän luotettavuus ei niistä juurikaan kärsinyt.

Beta-testauksen tuloksista voidaan todeta, että KingFisher Flexillä tarvitaan vähemmän uusintaeristyskiä. Uusintaeristykset alkuperäisissä näytteissä ovat johtuneet kontaminaatiosta tai niiden epäilystä. Perinteisellä menetelmällä suurin kontaminaatoriski ovat olleet huonot korkkierät, jotka pomppivat irti hauteissa. Ennen haudetta näytteet sekoitetaan, jolloin näytettä saattaa olla myös korkeissa. Kun korkit aukeavat hauteessa, niistä saattaa vapautua aerosoleja ja roiskua pisaroita viereisiin näyteputkiin, jolloin syntyy kontaminaatioita. Kontaminaatiot ovat selkeämpiä, jos jokin epätavallisempaa bakteeria sisältävä voimakaskasvuinen näyte on kontaminaation lähteenä. Vastaavaa kontaminaatio-ongelmaa ei ole automaatilla, sillä se suorittaa lämpöhauteet itse eikä eristettäessä käytetä juurikaan korkkeja.

6.5 Ajanoton tulokset

Beta-testaukseen kuului myös ajanotto eristuksen kulusta molemmilla menetelmillä. Eristysten kestoa on mitattu kokonaisuudessaan sekä vaiheisiin jaoteltuna. Tavoitteena oli saada tukea laitevalmistajan väitteelle, että automaatti nopeuttaisi eristystoimintaa. Eristyksen vaiheittaisen mittaamisen avulla ThermoFisher sai tutkia niin sanottua ”hands-on-time” ajan määrää, eli eritellä aikaa, jolloin automaatti tekee työt ja työntekijä voi hoitaa muita tehtäviä.

Ajanoton tuloksiin liittyy kuitenkin suuri epävarmuus, sillä eristuksen kokonaispituudet on määritetty seinäkellosta arvioiden, minkä vuoksi eristysten pituudet on merkitty viiden minuutin tarkuudella. Työvaiheiden kesto puolestaan on määritetty sekunttikelloa käyttäen. Mutta nekin ajat ovat vain suuntaa antavia, sillä eristäjät ovat itse mitanneet eri vaiheisiin kulutetun ajan, jolloin vaiheiden kellotus on monesti unohtunut tai kellon pysäyttäminen viivästynyt. Ajat on kuitenkin mitattu eri näytelevyistä, mikä saattaa vääristää tuloksia, koska näytteiden pipetoitavuus on saattanut vaihdella. Ajanoton on suorittanut aina eristäjä itse,

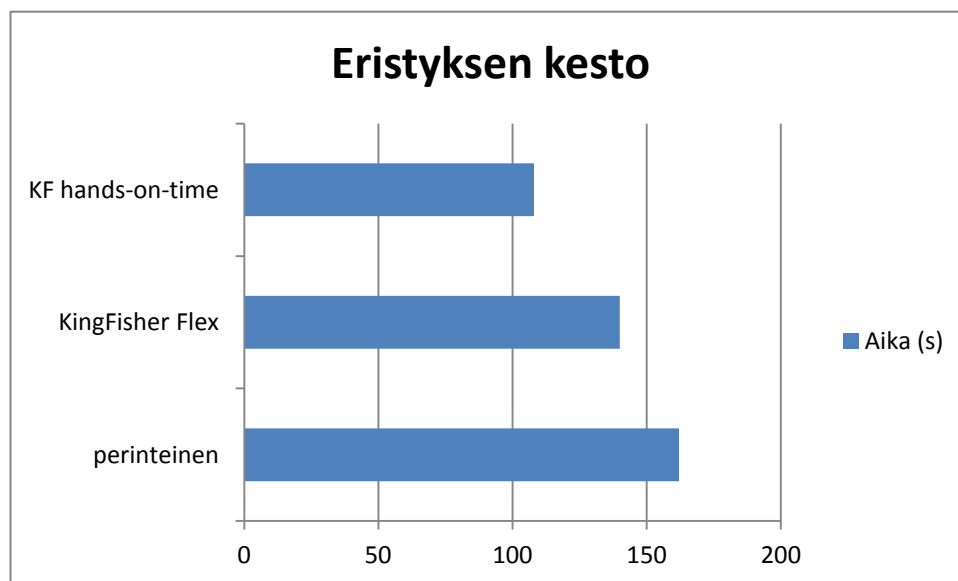
jolloin eri vaiheiden kellotus on saattanut alkaa eri tilanteesta työtavoista riippuen. Kaikki ajanoton tulokset on mitattu neljän levyn eristämisestä.

Taulukossa 13 näkyy vaiheittaisen ajanoton tulokset, jolla saadaan selville laitevalmistajan toivoma ”hands-on-time” -ajan keskiarvo. Taulukossa eri vaiheiden kestot on määritetty sekunteina, jotka on lopuksi pyöristetty keskiarvon yhteydessä minuuteiksi. Taulukon oikeassa alanurkassa on saatu laitevalmistajan toivoma ”hands-on-time” -aika, joka on summa kaikkiin työvaiheisiin kulutetusta ajasta.

Taulukko 13. Valion tuloksista laskettu KingFisher Flex –eristyksen ”hands-on-time” –aika.

	Aika (s)					
KF	2.huhti	3.huhti	4.huhti	5.huhti	KA	ka min
alkupipetointi(pesut)	1166	967	1007	1500	1160	19
maitojen pipet	1772	1783	1791	2160	1877	31
nesteiden poisto ja 872	946	1005		1230	1060	18
koneen täyttö	135	105	195		145	2
873	135	240	200	210	196	3
ReM	429	232	393	308	341	6
PCR ajoluikset			1761	1620	1691	28
määrä	4levyä	4levyä	4levyä	4levyä	yht	108
						1h 48min

Menetelmiin kuluttettua aikaa voidaan tarkastella kuviosta 15, sen mukaan perinteisellä menetelmällä eristämiseen kuluu noin 20 minuuttia enemmän aikaa kuin automaattilla eristämiseen. Kuviossa on myös automaattilla mitattu ”hands-on-time”, jonka mukaan työntekijälle jää noin 55 minuuttia enemmän aikaa muihin työtehtäviin kuin perinteisellä menetelmällä. Kuviossa 15 aikajana on esitetty minuutteina.



Kuvio 14. Eristysmenetelmien eristyksien kesto.

6.6 Raagenssien ja pipetinkärkien minimikulutus

Reagenssien ja pipetinkärkien minimikulutuslaskennalla pyritään arvioimaan kustannuksia aiheuttavien tarvikkeiden kulutusta kahdella eri eristysmenetelmällä. Alla olevissa taulukossa 14 ja 15 on laskelmat näiden tarvikkeiden kulutuksista molemmilla menetelmillä. Laskemat on tehty täydelle neljälle eli 96-kuoppaiselle levylle eristuksen alusta loppuun PCR-ajolevyjen pipetointi mukaan lukien. Laskelmissa ei ole huomioitu pipetointivirheitä tai vaikeammin pipetoitavia näytteitä, vaan on laskettu kunkin vaiheen tarvikkeiden minimikulutus.

Kuten taulukosta 14 voidaan nähdä, ei pipetinkärkien kulutus ole juurikaan muuttunut, sillä yhteenlaskettu minimikulutus on menetelmillä lähes sama. Tämä

johtuu siitä, että etenkin näytteiden eristämisvaiheiden alku ja sen pipetoinnit ovat hyvin samanlaisia, myös PCR-ajolevy pipetointi on pysynyt muuttumattomana.

Taulukko 14. Pipetinkärkien kulutus.

Pipetinkärkien kulutus			
KingFisher Flex		perinteinen	
kärkikoko(μ)	määrä (kpl)	kärkikoko (μ)	määrä (kpl)
2050 μl	136	2050 μl	232
1000 μl	97	1000 μl	98
250 μl	97	250 μl	97
200 μl	192	200 μl	104
yht.	522	yht.	531

Taulukossa 15 on tutkittu reagenssien kulutusta menetelmien välillä. Taulukon arvoista suurempi kulutus on tummennettu. Taulukosta nähdään, että kaikki suurimmat arvot osuvat KingFisherille. Sen lisäksi, että automaatin avulla eristämiseen tarvitaan huomattavasti enemmän reagensseja, on niitä myös kaksi enemmän. Koska uusi eristysmenetelmä kuluttaa jopa 200 ml enemmän reagensseja, ei se ainakaan siltä osin tuo säästöjä pidemmälläkään aikavälillä.

Taulukko 15. Reagenssien kulutus.

Reagenssien kulutus			
KingFisher Flex		perinteinen	
reagenssi	määrä (μl)	reagenssi	määrä (μl)
AW1	124800	AW1	48000
AW2	96000	AW2	48000
Tween-vesi	57600	AI	20000
AE	14400	AE	9600
871	38400	871	35000
872	9600	872	9600
Proteinaasi K	3840	Proteinaasi K	2700
etanoli	20200	etanoli	19200
RTL	20200		
Mag	4040		
yht.	389 ml	yht.	192 ml

6.7 Kokemusperäiset kokemukset

Työssä on haluttu tuoda esille työntekijöiden kokemukset ja mielipiteet KingFisher Flex -eristysautomaatin käytöstä. Samalla laitevalmistajan pyynnöstä on kartoitettu menetelmän epäkohtia ja mahdollisia parannusehdotuksia, jotta laitteen eristysmenetelmää voidaan kehittää edelleen helpommaksi ja varmemmaksi.

Työntekijöiden mielestä automaatti helpottaa paljon työtä ja on stressittömämpi eristysmenetelmä. Samalla menetelmä vaikuttaa nopeammalta, kätevämmältä ja selkeämmältä. Eräs työntekijä kuvaili eristämistä myös siistimmäksi, koska näytteitä käsiteltäessä ei tarvitse olla yhtä paljon tarvikkeita kuin perinteisessä käsineristyksessä. Laboratoriossa on usein kaksi eristäjää yhtä aikaa omien näytteiden kanssa, minkä vuoksi perinteisellä menetelmällä näytteitä on joutunut jonottamaan sentrifuugiin ja hauteisiin. Koska KingFisherillä eristettäessä sentrifuugia tarvitaan vain kerran ja kone lämmitää näytteet itse, jolloin hauteita ei enää tarvita, ei näytteitä tarvitse enää jonottaa.

KingFisher -menetelmässä on kuitenkin myös omat hankalat vaiheensa. Aluksi lysaatille pipetointi oli hyvinkin hankalaa ja epävarmaa, koska rivien numerointi näkyi huonosti. ThermoFisheriltä ehdotettiin, että puhdasta osaa levystä voisi suojata esimerkiksi foliolla tai paperilla, tätä ei kuitenkaan ole enää myöhemmässä vaiheessa tarvinnut tehdä, kun työ on rutinoitunut. Pipettiä ei kuitenkaan kannata kuljettaa muiden avonaisten kuoppien ylitse, sillä vaarana on aina muiden näytteiden kontaminoituminen. Pipetoitaessa näytteitä lysaatille kärjet eivät saa osua muualle kuin vain niihin kaivoihin, joihin näyte on siirrettävä. Edelleen 872 raegenssin lisäys ja näytteiden siirtäminen ovat aikaa vievin osa eikä näytteiden siirtäminen aina onnistu kerralla. Usein kokkareisten ja hyvin viskoottisten näytteiden liuottamiseksi on lisättävä steriloitua vettä ja näytettä on pumpattava pidempään. Automaatilla eristetyt tulokset arvioidaan kuitenkin yleisesti luotettavammiksi, sillä niissä ei ole korkkien aukeilusta johtuvia kontaminaatioita.

Uuden malliset levyt tuntuivat hankalammilta vanhan menetelmän levyihin verrattuna, sillä rivien numerointi ei erottunut niin selkeästi ja pipetointikin näiltä oli hankalampaa. Tähän on kuitenkin totuttu ja apuna on keksitty käyttää piirrosviivoja. Myös näytteiden siirto tuntui erityisen vaikealta, sillä näytteissä

olevat klimpit tuottivat ongelmia. Jos vaikeisiin tapauksiin kuitenkin lisää vettä 100 µl, ne saadaan hajotetuksi paremmin. Kun näytteen saa homogenisoitua, niin se ei todennäköisesti joudu uusintaan, kun taas klimppiä hajottamatta uusinnan todennäköisyys on suurempi.

Automaatilla eristettäessä proteinaasi K:n lisäys näytteiden joukkoon on koettu hankalaksi näkyvyyden vuoksi. Koska pipetoitavan nesteen määrä on niin pieni, ei kaivoista voi nähdä jälkikäteen, mihin reagenssia on jo lisätty. Tällöin keskittymisen herpaantuessa ei välttämättä tiedetä, onko kaikkiin kaivoihin jo lisätty reagenssia. Parannusehdotuksena tähän ehdotettiin väriaineen lisäämistä kyseiseen reagenssiin.

Perinteisen menetelmän syvät pesulevyt olivat pestäviä ja uudelleen käytettäviä. KingFisherin pesu- ja näytelevyt puolestaan ovat kertakäyttöisiä, minkä vuoksi jätettä kertyy enemmän. Työntekijät olisivat toivoneet jätemäärän vähentämiseksi, että puoliksi käytettyjen levyjen puhdasta puolta voisi käyttää myöhemmin toisessa eristyksessä. Tätä laitevalmistaja kuitenkin kehoittaa välttämään, sillä siihen liittyy suurempi kontaminaatoriski.

Lisäksi mahdollisten virtakatkosten varalta toivottiin automaatin eristysohjelmaan useampia aloituspisteitä, jotta eristysohjelman voisi aloittaa vaiheesta ennen katkosta. Eristyshjelma oli siis aloitettava alusta, jos virta katkesi tai laitteessa ilmeni jokin toiminnan seisauttava vika. Tähän ThermoFisher on tehnyt korjauksen ja eristysohjelman voi nyt aloittaa mistä tahansa vaiheesta, jos laitteeseen on kytketty tietokone.

7 LOPPUPÄÄTELMÄT

Loppupäätelmissä arvioidaan KingFisher Flex eristysmenetelmän luotettavuutta, sen mukaan miten paljon eri menetelmien tulokset kaikkiaan eroavat. Jos tuloseraja on suhteellisen vähän, voidaan uutta KingFisher Flex- erityysautomaattia pitää luotettavana. Tässä kappaleessa arvioidaan myös mitä saaduista tutkimustuloksista voidaan päätellä ja mitä tutkimuksesta on seurannut.

7.1 Eristysmenetelmän luotettavuus

Taulukossa 11 oli testauksessa eristettyjen tulosten yhteneväisyys keskimäärin 73%. Arvoa voidaan pitää suhteellisen hyvänä tuloksena, sillä eristäjiä on ollut useita, joista harvalla on ollut automaatin eristysmenetelmä kunnolla hallussa. Koska beta-testaus hoidettiin muiden näytteiden ohella, lisäeristysten tekeminen tuotti välillä kiirettä, jolloin eristystarkkuus on saattanut vaihdella. Tästä kertovat osittain myös KingFisher Flex -eristyksissä sattuneet kontaminaatiot ja muut huolimattomuudet.

Tuloseroihin sisältyy kontaminaatioita, joita esiintyi vanhalla menetelmällä aukeilevien ja huonolaatuisten korkkien vuoksi. Uudella menetelmällä oli myös eristäjien kokemuksen puutteesta johtuvaa hutilointia ja epätarkkuutta. Osittain tuloksissa näkyi myös automaatin näytteiden toisarvoisuus, sillä näytteiden tekemiseen ei aina ollut riittävästi aikaa ja varsinaisia näytteitä pidettiin priorisoinnissa ylempänä. Häiriötekijöistä huolimatta tuloksista saatiin riittävän yhteneväiset, jotta laite voitiin luokitella soveltuvaksi myös mastiittinäytteiden eristämiseen.

Laitteen testausvaiheessa pyydettiin huomioimaan, jos eristyksessä olisi havaittavissa jotain epätavallista. Yksi tällaisista oli eluutio-levyllä joissakin näytteissä esiintyneet limat. Kyseisten näytteiden tulokset huomioitiin erikseen, mutta eroja tulosten välillä alkuperäsiin nähden ei havaittu, joten limoilla ei todettu olevan vaikutusta näytteiden tuloksiin.

Ajallisesti näytteiden tulokset valmistuvat korkeintaan puoli tuntia nopeammin kuin perinteisellä menetelmällä, joten näytteiden valmistumisnopeuteen laite ei suuresti vaikuttanut. Kuitenkin laitteen avulla pipetoinnin kuormitusta saatiin vähennettyä. Koska näytteitä ei automaattilla eristettäessä tarvitse käsitellä niin paljon, jää työntekijällä aikaa muihin tehtäviin, mikä on erittäin tärkeää näytemäärien lisääntyessä. Työn kuormittavuuden vähenemisen eristyksen aikana tuo selkeämmin esille "hands-on-time"-aika. Kuviossa 15 todettiin KingFisherin vähentävän eristyksen työaikaa perinteiseen verrattuna jopa 55 minuuttia. Vaikka näytteiden valmistumisaika ei kovin paljon nopeudu, voidaan näytteitä kuitenkin päivän mittaan eristää nopeammin automaatin avulla.

Ajankäytön yhteydessä voidaan epäillä, onko työnantajan kannalta taloudellista luoda työntekijälle enemmän aikaa eristysten oheen ja löytyykö sille ajalle merkittävää tekemistä. Nämä epäilyt voidaan kumota laboratorion näytemäärien lisääntymisellä. Näytteiden ollessa automaatissa työntekijä voi valmistella seuraavaa eristystä tai tarkistaa edellisten näytteiden tuloksia. Toisaalta on tärkeää vähentää työn kuormittavuutta ja antaa enemmän aikaa työtehtäviin.

Yksi laitevalmistajan väitteistä oli uusintojen väheneminen käytettäessä automaattia. Uusinnat johtuvat PCR-laitteiden näytteiden lukemisen ongelmista. Tällöin DNA-monistus ei ole toiminut toivotusti, mikä johtuu siitä, että näytteessä on liikaa häiriötekijöitä, kuten valkuaisaineita tai bakteerikasvu on liian voimakas. Koska automaatin avulla DNA saadaan paremmin puhdistettua, eivät näytteen epäpuhtaudet häiritse DNA:n monistusta PCR-reaktiossa. Samasta syystä arvellaan, että automaatilla eristetyistä näytteistä löytyy paremmin myös pienet bakteeriesiintymät. Yleisten bakteerien pienillä esiintymillä ei kuitenkaan välttämättä ole merkitystä lehmän terveyden tai hoidon kannalta, jolloin ne voivat vain hämmentää tuottajia tai aiheuttaa lehmälle tarpeetonta lääkitystä. Seuraavassa taulukossa 16 vertaillaan uusintojen määrää eri menetelmien välillä. Taulukon tulokset eivät tue väitettä uusintojen vähenemisestä laitteen avulla.

Taulukko 16. Uusintojen määrät eri menetelmillä.

näyte määrä	uusinnat perinteinen	uusinnat KingFisher
8	0	0
22	0	0
45	2	0
91	0	3
91	3	0
45	0	1
22	1	2
76	3	0
91	1	1
91	1	4
91	1	0
68	1	1
68	0	0
91	0	1
91	3	3
91	3	0
91	0	1
91	0	2
91	1	1
91	3	5
91	3	2
yhteensä	1537	27

KingFisherin uusintojen määrään on luultavasti vaikuttanut eristystekniikka, johon ei laitteen testausvaiheessa ollut vielä kehittynyt rutiinia. KingFisherillä näytteiden uusintaan vaikuttaa suuresti niiden liuottaminen siirrettäessä näytteitä lysaatile. Mitä paremmin näyte saadaan homogenisoitua, sen paremmin laite puhdistaa DNA:n, jolloin PCR-monistuksessa on vähemmän häiriötekijöitä. Automaatin beta-testauksessa eristykseen pyrittiin valitsemaan mahdollisimman hankalia näytteitä, jotta laitteen eristystarkkuus saataisiin koetukselle. Näytteiden liuottamiseen ei kuitenkaan kiinnitetty erityisesti huomioita näytteiden toisarvoisuuden, kiireen ja vaiheen tärkeyden ymmärryksen puutteen vuoksi. Koneen myöhemmässä käytössä on kuitenkin alettu ymmärtää liuotusvaiheen tärkeys, jolla on selvästi yhteys uusintojen vähentämiseen. Beta-testauksen aikana saadut tulokset uusintojen määristä eivät ole täysin luotettavia ja vertailukelpoisia keskenään.

7.2 KingFisher-eristysautomaatin edut ja haitat

Eristysautomaatin testaus tuli laitevalmistajan kannalta ajallisesti oikeaan hetkeen, sillä mikroputkien korkkien kanssa oli ongelmia. Huomattavin välitön etu automaatilla eristettäessä olikin korkkien aukeilusta johtuvien kontaminaatioiden välttäminen. KingFisherillä mikroputkiin laitetaan korkit vain kerran, jolloin niiden aukeilu ei ole vielä ongelmana. Vaikka korkkien kiinni pysymistä on silti alkusekoituksen aikana valvottava, niiden aukeileminen on helposti estettävissä. Kun eristyksessä ei tarvitse kiinnittää erityistä huomioita mikroputkien korkkeihin, voidaan keskittyä paremmin näytteiden eristämiseen. Myös tulosten tarkistaminen on helpompaa, kun jokaisen näytteen kohdalla ei tarvitse epäillä kontaminaatiota.

KingFisher Flex mahdollistaa nopeamman DNA:n puhdistamisen. Aikaa kuluu keskimäärin noin puoli tuntia vähemmän kuin ilman automaattia, kuten kuviosta 15 käy ilmi. Myös laitteella suoritettava utaretulehdusnäytteiden eristämisen prosessi on helpompi ja yksinkertaisempi kuin perinteisellä menetelmällä. Automaatilla eristäminen ei vaadi yhtä paljon käsityötä, pipetointia, ravistelua tai näytteiden siirtelyä sentrifuugiin ja vesihauteisiin. KingFisherillä on mahdollista pipetoida pesulevyt ennalta, mikä nopeuttaa ja helpottaa eristämisen prosessia. ThermoFisherin mukaan pesut on mahdollista pipetoida valmiiksi säilytykseen kolmeksi viikoksi, mutta haihtuvuus alkaa vaikuttaa tuloksiin noin viikon jälkeen lisäämällä uusintojen määrää.

KingFisher Flexillä kontaminaatoriski on pienempi. Automaatilla eristettäessä suurin osa näytteiden käsittelystä tapahtuu laitteen suojakannen alla, jolloin näytteisiin ei pääse ympäristöstä kontaminantteja. Kontaminaatoriskiä pienentää myös käsityön väheneminen, jolloin hengitysilman ja kosketuksen kautta siirtyvät bakteerit eivät pääse kontaminoimaan näytteitä niin herkästi.

KingFisher Flex tehostaa työntekijän työaika. Sen lisäksi, että automaatilla eristäminen on nopeampaa, se myös sitoo työntekijää vähemmän eristämisen aikana kuin perinteinen menetelmä. Näytteiden ollessa laitteessa inkuboinnissa ja sekoituksissa, voi työntekijä esimerkiksi valmistella jo seuraavaa vaihetta, siivota edellisten työvaiheiden jälkiä tai tarkistaa edellisten ajojen tuloksia.

Suurin osa uusinnoista voidaan ehkäistä. Vanhalla menetelmällä näytteiden mahdollisesta uusimisesta viittasi suodattimen läpäisemättömyys viimeisen pesuliuoksen jälkeen tai loppunäytteen kupera pinta mikroputkessa. KingFisher-eristyksessä uusinnan voi ennakoida siirrettäessä näytteitä lysaatile. Jos näyte ei ole homegeeninen, se päättyy usein uusintaan. Näytteen joutuminen uusintaan voidaan kuitenkin ehkäistä liuottamalla näyte paremmin, jotta siitä saadaan homogeeninen. Huolellisesti liuotetusta näyteestä laite saa helpommin puhdistettua DNA:n epäpuhtauksista.

Automaatin toimintaa voi tarkkailla liittämällä se tietokoneeseen. Tietokoneen avulla voidaan tarkemmin seurata, pääseekö laite vaadittuihin lämpötiloihin ja mahdollisten toimintahäiriöiden yhteydessä voidaan paikantaa, missä vaiheessa se on ilmennyt. Tietokoneeseen liitetynä eristäminen voidaan aloittaa halutusta vaiheesta, jolloin vian sattuessa eristämistä ei tarvitse aloittaa alusta, vaan voidaan jatkaa siitä, mihin eristys on jäänyt.

Eristysautomaattiin sijoittamisen kannattavuudesta kertovat tutkimuksen tulokset menetelmiin kulutetusta ajasta ja tarvikkeiden käytöstä. Pipetinkärkien kulutuksessa uusi menetelmä osoittautui etenkin ohjelmistomuutosten myötä säästäväisemmäksi, mutta regenssien kulutuksen kannalta, jotka ovat ehdottomasti kalleimpia DNA:n eristämiseen käytettäviä tarvikkeita, menetelmä on kallimpi. Tämän vuoksi ei siltä osin pidemmässäkään käytössä saada säästetyksi automaattien hankintahintaa. Laitteen kannattavuus tulee lähinnä sairauspoissaolojen vähenemisenä, josta vuosien myötä saadaankin suuret säästöt, mutta vain jos laitteen lisäksi saadaan pesujen pipetointia helpottava annostelulaite. Tämä on oleellista niska- ja hartiasseudun särkyjen vähentämiseksi, sillä pesujen pipetointi tehdään lähinnä sarjatyönä, mikä kasaa kuormituksen yleensä yhdelle työntekijälle kerrallaan. Jotta työn kuormittavuus saataisiin selvästi vähenemään, on eristysautomaattien rinnalle hankittava annostelulaite, joka hoitaisi pesulevyjen pipetoinnin työntekijöiden puolesta.

Esimerkkejä esiintyneistä toimintahäiriöistä:

- Puoli vuotta aiemmin hankittu laite piti kovempaa ääntä ja täristi enemmän pöytää kuin uusi. Koneen kanssa oli myös ongelmana saada se poimimaan kampa eristystä aloitettaessa. Laitteessa oli kuitenkin takuuta vielä jäljellä.
- Uuden laitteen kanssa ongelmana puolestaan oli se, että kampa nousi levyltä pesujen yhteydessä kaivojen toista reunaa pitkin jättäen reunaan valumajäljet. Tämä puoltaminen saattoi aiheuttaa kontaminaatioita eristyksissä ja oli jo aiheuttanut pari laitteen toiminnan keskeytystä kamman asennosta johtuen. Sama vika oli myös toisessa laitteessa ennen sen ensimmäistä huoltoa.

7.3 Tutkimuksen seurauksia

Tutkimustulosten ollessa enimmäkseen positiivisia, on Valion seinäjoen aluelaboratorio investoinut KingFisher Flex- eristysautomaattiin. Loppukesästä 2012 aloitettiin työntekijöiden perehdytys utaretulehdusnäytteiden eristämiseen eristysautomaatilla. Saman vuoden syyskuussa utaretulehduslaboratoriossa siirryttiin käyttämään vain automaattieristystä. Vuoden 2013 budjetissa oli toinen vastaava laite, joka otettiin käyttöön helmikuussa 2013. Tämä on hankittu näytemäärien lisääntymisen vuoksi ja siltä varalta, että toinen laite joutuu pidempään huoltokatkoon. Toisen automaatin hankintapäätökseen vaikutti vahvasti syksyllä 2012 automaatin kanssa ilmennyt kontaminaatio-ongelma: laitteen magneettisauvat nousivat näytekolojen seinää pitkin, jolloin sauvojen mukana näytteitä pääsi seuraavaan kaivoon ja näytteet kontaminoivat toisiaan.

Jo laitteen beta-testauksen aikana huomattiin, että automaatin eristysmenetelmä on vielä kehittyvä. Testausvaiheessa vaihdettiin matalat eluutiolevyt korkeammiksi. Korkeammilla levyillä näytteiden sekoittuminen nesteeseen pinnannousun yhteydessä on paljon epätodennäköisempää. Beta-testauksen jälkeen on tehty muutoksia muun muassa proteinaasi K:n suhteen. Reagenssiin toivottiin väriainetta työvaiheen helpottamiseksi, mutta sitä ei pystytty lisäämään. Menetelmää oli kuitenkin mahdollista muuttaa niin, että proteinaasi K voidaan nyt pipetoida levyille

jo ennen näytteitä ja siis ennen kuin levy laitetaan automaattiin. Kun reagenssi pipetoidaan tyhjälle levylle, pystytään näkemään, mihin sitä on jo laitettu, vaikka määrä onkin pieni. Tämän protokollan muutoksen ansioista myös eristykseen käytettävien kärkien määrä vähenee, koska reagenssi voidaan pipetoida joka kaivoon samoilla kärjillä. Alla olevaan pipetin kärkien minikulutusta kuvaavaan taulukkoon 17 on lisätty KingFisherillä muutoksen jälkeen kuluvien kärkien määrä.

Taulukko 17. Pipetinkärkien kulutus eri menetelmillä.

Pipetinkärkien kulutus					
perinteinen		KingFisher Flex		KF päivitetty	
kärkikoko (μ)	määrä (kpl)	kärkikoko(μ)	määrä (kpl)	kärkikoko (μ)	määrä (kpl)
2050 μl	232	2050 μl	136	2050 μl	136
1000 μl	98	1000 μl	97	1000 μl	97
250 μl	97	250 μl	97	250 μl	97
200 μl	104	200 μl	192	200 μl	104
yht.	531	yht.	522	yht.	434

Taulukon 17 mukaan kärkien kulutus KingFisherillä on vähentynyt lähes sadalla kappaleella. Menetelmän muutoksen myötä automaatin eristysmenetelmä on myös kärkien kulutuksessa kannattavampi vaihtoehto.

8 YHTEENVETO

Tutkimuksen aiheena oli uuden KingFisher Flex eristysautomaatin beta-testaus, jonka tavoitteena oli selvittää laitteen soveltuvuus utaretulehdusnäytteiden bakteerian DNA:n eristämiseen. Utaretulehdusnäytteet poikkeavat tavallisista DNA-näytteistä suuremman valkuaisainepitoisuuden ja muiden PCR-ajoa häiritsevien maidon komponenttien vuoksi.

Tavoitteena oli tutkia automaatin soveltuvuutta utaretulehdusnäytteille eristämällä samat näytteet kahdella menetelmällä. Toinen menetelmä oli perinteinen Valiolla käytössä oleva paljon käsityötä vaativa menetelmä ja toinen oli KingFisher Flex-eristysautomaatti. Samojen näytteiden tuloksia verrattiin keskenään ja tutkittiin kuinka paljon niissä oli poikkeavuuksia. Tuloksissa esiintyy aina jonkin verran poikkeavuuksia, vaikka eristäjä ja menetelmä olisivat samat, koska etenkin KNS-bakteeri esiintyy maidossa epätasaisesti ryppäinä. Ihmisten väliset pipetointierot pyrittiin minimoimaan uuden menetelmän perehdytyksellä. Menetelmien välillä on siis jonkin verran tuloseroja, joten tehtävänä olikin selvittää raja, jonka mukaan määritetään, voidaanko automaattiin tuloksiin luottaa.

KingFisher Flex -laitteita on hankittu Valion seinäjoen aluelaboratorioon kaksi kappaletta, joiden yhteishinta on noin 100 000€. Laite on testikäytetty Valion laboratoriossa ennen ostopäätöksiä ja näin koettu soveltuvaksi utaretulehdusnäytteille ja vähentävän merkittävästi työn kuormittavuutta. Työn kuormittavuus on johtanut yhden työperäisen rasitusvamman leikkaukseen ja neljän muun työntekijän vastaavan alueen särkyihin. Laite siis maksaa itsensä takaisin lähinnä sairauspoissaolojen vähenemisenä, mutta vain jos laitteen lisäksi saadaan pesujen pipetointia helpottava annostelulaite.

Valion Seinäjoen aluelaboratoriossa eristysautomaattien käyttövarmuuteen ei toistaiseksi ole panostettu kunnolla, koska niitä ei ole liitetty tietokoneisiin. Mutta koska laitteita on hankittu kaksi, ei eristysautomaatin pitkään huoltoseisokki aiheuta toimintakatkoksia. Vaikka laitteiden kunnossapito on lähinnä laitevalmistajien käsissä, laitteiden toimintakuntoa valvovat käyttäjät, jotka usein tekevät myös vikadiagnoosin ja osan pienistä korjaus- ja huoltotöistä. Tähän ei käyttäjiä kuitenkaan varsinaisesti kouluteta, vaan lähin apu on ohjekirja.

Tutkimustyön päätöksenä voidaan todeta että KingFisher Flex-eristysautomaatti soveltuu utaretulehdusnäytteiden diagnosointiin. Laitteesta on hyötyä etenkin, jos eristettävien näytteiden määrä on suuri kuten Valiolla, jossa eristetään yli 300 mastiittinäytettä jokaisena arkipäivänä. Suuren näytemäärän vuoksi onkin tärkeää, että työn kuormittavuutta saadaan vähennettyä eristysautomaatin avulla.

LÄHTEET

- Blowey, R. & Edmondson, P. 2010. Mastitis control in dairy herds. 2. painos. Oxfordshire: CAB International.
- Brofeldt, E. 1991. Maidon laatu. Teoksessa: Konelypsyopas. Maatalouskeskusten Liitto. 4-12.
- Bylund, G. 1995. Dairy processing handbook. Ruotsi: Tetra Pak Processing Systems AB
- Hakala, M. 2004. Maidon koostumus ja laatutekijät. Seinäjoen ammattikorkeakoulun julkaisusarja D: Opinnäytteitä 16.
- Hartikainen, K. 2005. Utaretulehdusnäytteen otto ja lähettäminen. Maatilan Pellervo: Terve eläin (8). 20-21.
- Honkanen-Buzalski, T. & Seuna, E. 1993. Utaretulehdusmaidon mikrobiologinen diagnostiikka. Teoksessa: Sandholm, M. Utareen sairaudet. 2. uudistettu painos. Helsinki: Eläinlääketieteellinen korkeakoulu.
- Honkanen-Buzalski, T. 1991. Utaretulehduksen synty. Teoksessa: Konelypsyopas. Maatalouskeskusten Liitto. 63-69.
- Honkanen-Buzalski, T. 1993. Maitonäytteen otto, kuljetus ja anamneesi. Teoksessa: Sandholm, M. Utareen sairaudet. 2. uudistettu painos. Helsinki: Eläinlääketieteellinen korkeakoulu.
- Kaartinen, L. 1993. Utareen fysiologia. Teoksessa: Sandholm, M. Utareen sairaudet. 2. uudistettu painos. Helsinki: Eläinlääketieteellinen korkeakoulu.
- Knuutila, J. 2010. Uusi, nopea ja luotettava menetelmä utaretulehdusdiagnostiikkaan. Maatilan Pellervo: Terve eläin (3). 12-16.
- Korhonen, H. 1993. Utaretulehduksen meijeritekniinen ja –taloudellinen merkitys. Teoksessa: Sandholm, M. Utareen sairaudet. 2. uudistettu painos. Helsinki: Eläinlääketieteellinen korkeakoulu.
- Korhonen, H. & Kaartinen, L. 1993. Utaretulehduksen aiheuttamat muutokset maidon koostumuksessa. Teoksessa: Sandholm, M. Utareen sairaudet. 2. uudistettu painos. Helsinki: Eläinlääketieteellinen korkeakoulu.
- Korhonen, H. & Sandholm, M. 1993. Utareen puolustusreaktiot. Teoksessa: Sandholm, M. Utareen sairaudet. 2. uudistettu painos. Helsinki: Eläinlääketieteellinen korkeakoulu.

- Laitinen, H. 1991. Lypsykoneen puhdistus. Teoksessa: Konelypsyopas. Maatalouskeskusten Liitto. 83-95.
- Laitinen, P. & Väliisaari, S. 2003. Staphylococcus aureus-bakteerien aiheuttaman utaretulehduksen ennaltaehkäisy ja hoito lypsykarjatiljoilla. Seinäjoen ammattikorkeakoulun julkaisusarja B: Raportteja ja selvityksiä 14.
- Lehtonen, S. 2012. Uudenlaista utaretulehdusta Savossa. Maaseudun Tulevaisuus. 28.12.2012, 11.
- Maatilan Pellervo. 2005. Utaretulehdusten hoitosuositukset. Maatilan Pellervo: Terve eläin (8). 22-25.
- Mantere-Alhonen, S. 1993. Maidon koostumus. Teoksessa: Sandholm, M. Utareen sairaudet. 2. uudistettu painos. Helsinki: Eläinlääketieteellinen korkeakoulu.
- Matilda maataloustilastot. 2013a. Kotieläinten lukumäärä. [Verkkosivu]. Helsinki: Maa- ja metsäministeriön tietopalvelukeskus Tike. [Viitattu 21.3.2013]. Saatavana: <http://www.maataloustilastot.fi/tilasto/36>.
- Matilda maataloustilastot. 2013b. Maataloustuotteiden tuottajahinnat. [Verkkosivu]. Helsinki: Maa- ja metsäministeriön tietopalvelukeskus Tike. [Viitattu 21.2.2013]. Saatavana: <http://www.maataloustilastot.fi/tilasto/5>.
- Matilda maataloustilastot. 2013c. Maatilarekisteri – Maatilojen rakenne 2012. [Verkkosivu]. Helsinki: Maa- ja metsäministeriön tietopalvelukeskus Tike. [Viitattu 21.3.2013]. Saatavana: <http://www.maataloustilastot.fi/tilasto/32>.
- MT. 2012. Mykoplasmaa Suomen vasikoissa. Maaseudun Tulevaisuus. 28.11.2012, 5.
- Palva, A. 2007. DNA:n eristysmenetelmien vertailu elintarvikenäytteille erilaisilla näytematriiseilla. Stadia Helsingin ammattikorkeakoulu. Tekniikan ja liikenteen toimiala, Laboratorioalan koulutusohjelma. Opinnäytetyö. Julkinen.
- Perttilä, R. 1991. Lypsy. Teoksessa: Konelypsyopas. Maatalouskeskusten Liitto. 50-62.
- Raekallio, M. & Honkanen-Buzalski, T. 1993. Utaretulehdusbakteerien alkuperä. Teoksessa: Sandholm, M. Utareen sairaudet. 2. uudistettu painos. Helsinki: Eläinlääketieteellinen korkeakoulu.
- Rajala, H. 1993. Nautakarjatalous. 5. tarkistettu painos. Helsinki: Kirjayhtymä Oy.
- Rämä, P. 2012. Henkilökohtainen sähköpostivaihto.

- Sandholm, M. 1993. Tulehdusvaste utaretulehduksessa. Teoksessa: Sandholm, M. Utareen sairaudet. 2. uudistettu painos. Helsinki: Eläinlääketieteellinen korkeakoulu.
- SEY. Ei päiväystä. Vasikasta lypsylehmäksi tai lihanaudaksi. [Verkkosivu]. Helsinki: SEY Suomen eläinsuojeluyhdistysten liitto ry. [Viitattu 25.3.2013]. Saatavana: http://www.sey.fi/elaintietoa/tuotantoelaimet/naudat/vasikasta_lypsylehmaksi_tai_lihanaudaksi#Lypsylehmt
- Suominen, I. & Ollikka, P. 2004. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. 3-2 painos. Helsinki: Opetushallitus.
- Taipale, T. 2011. Utareterveys parantunut Suomessa. Maaseudun Tulevaisuus. 12.12.2011, 10.
- Thermo Fisher. 2008. Thermo Fisher Scientific KingFisher Flex: Product specifications. Thermo Fisher Scientific Inc. [Viitattu 30.3.2013] Saatavana: <http://www.thermoscientific.com/ecommerce/servlet/productsdetail?productId=11960640&groupType=PRODUCT&searchType=0&storeId=11152&from=search>
- Thermo Fisher. 2010. Thermo Scientific KingFisher Flex user manual. 2. painos. [Viitattu 30.3.2013] Saatavana: <http://www.thermoscientific.com/ecommerce/servlet/productsdetail?productId=11960640&groupType=PRODUCT&searchType=0&storeId=11152&from=search>
- Thermo Fisher. 2012. PathoProof KingFisher Flex DNA-eristyksen vaiheet. Moniste.
- Torikka, T. 2013. Utaretulehdukset vähentyneet 20 vuotta. Maaseudun Tulevaisuus. 1.3.2013, 8.
- Yli-Hynnilä, M. 2005. Utaretulehdus tarttuu terveeseen lehmään sairaasta lehmästä tai ympäristöstä. Maatilan Pellervo: Terve eläin (8). 14-15.
- Valio. Ei päiväystä. Hyvän tuotteen alku on hyvässä raaka-aineessa. [Verkkosivu]. Helsinki: Valio Oy. [Viitattu 25.3.2013]. Saatavana: <http://ammattilaiset.valio.fi/portal/page/portal/valioyrittajayritystieto/maidontuotanto>.

LIITE 1: Perinteisen eristysmenetelmän pikaohje**PCR ERISTYS**

1. Lisää 350 ul maitonäytettä ja 350 ul (873+871) seosta putkiin.
2. Vorteksoi näytteet ja inkuboi 55 C:ssa 5 min.
3. Sentrifugoi 5 min.
4. Poista neste (850 ul) pipetoimalla. Volume hitaalle.
5. Lisää 100 ul 872. Pumppaa!
6. Inkuboi 37 C:ssa 10 min.
7. Valmista seos (873 + Buffer A1)
Lisää 220 ul seosta putkiin. Volume normaali.
8. Sekoita 15 s.
9. Inkuboi 55 C:ssa 10 min.
10. Sentrifugoi lyhyesti.
11. Lisää 200 ul etanolia. Ravista 15 s.
12. Sentrifugoi lyhyesti.
13. Poista ”klimpit” pipetillä.
14. Aseta QIAamp 96 –levy S-Blockin päälle. Pipetoi näytteet (650 ul) levyille. Sulje teipillä.
15. Sentrifugoi 4 min.
16. Lisää 500 ul Buffer AW1. Teippi!
17. Sentrifugoi 4 min.
18. Lisää 500 ul AW2. **Ei teippiä!**
19. Sentrifugoi 15 min.
20. Aseta QIAamp 96 –levy Elution Microtubes –putkien päälle.
21. Lisää 100 ul Buffer AE. Teippi!
22. Sentrifugoi 4 min. Sulje keltaisilla korkeilla.

1-4 : Solujen poisto
 5-11 : Bakt.solujen
 hajotus
 Etanoli saostaa
 => solun pesu
 21 : Puhdas DNA

1 levy (22 näytettä + EO + PCR0) (+8 ylim.)

$$871 = 350 \text{ ul} * 31 = 10\,850 \text{ ul}$$

$$873 = 7 \text{ ul} * 31 = 217 \text{ ul}$$

$$872 = 100 \text{ ul} * 31 = 3100 \text{ ul}$$

$$873 = 20 \text{ ul} * 31 = 620 \text{ ul}$$

$$A1 = 200 \text{ ul} * 31 = 6200 \text{ ul}$$

3 levyä (68 näytettä + EO + 3 PCR0)

$$871 = 350 \text{ ul} * 80 = 28000 \text{ ul}$$

$$873 = 7 \text{ ul} * 80 = 560 \text{ ul}$$

$$872 = 100 \text{ ul} * 80 = 8000 \text{ ul}$$

$$873 = 20 \text{ ul} * 80 = 1600 \text{ ul}$$

$$A1 = 200 \text{ ul} * 80 = 16000 \text{ ul}$$

AJO:

$$1 \text{ levy: Master Mix} = 264 \text{ ul}$$

$$\text{Primer Mix} = 132 \text{ ul}$$

$$3 \text{ levyä: Master Mix} = 792 \text{ ul}$$

$$\text{Primer Mix} = 396 \text{ ul}$$

2 levyä (45 näytettä + EO + 2 PCR0)

$$871 = 350 \text{ ul} * 54 = 18\,900 \text{ ul}$$

$$873 = 7 \text{ ul} * 54 = 378 \text{ ul}$$

$$872 = 100 \text{ ul} * 54 = 5400 \text{ ul}$$

$$873 = 20 \text{ ul} * 54 = 1080 \text{ ul}$$

$$A1 = 200 * 5 = 10\,800 \text{ ul}$$

4 levyä (91 näytettä + EO + 4 PCR0)

$$871 = 350 \text{ ul} * 100 = 35\,000 \text{ ul}$$

$$873 = 7 \text{ ul} * 100 = 700 \text{ ul}$$

$$872 = 100 \text{ ul} * 100 = 10\,000 \text{ ul}$$

$$873 = 20 \text{ ul} * 100 = 2000 \text{ ul}$$

$$A1 = 200 \text{ ul} * 100 = 20\,000 \text{ ul}$$

$$2 \text{ levyä: Master Mix} = 528 \text{ ul}$$

$$\text{Primer Mix} = 264 \text{ ul}$$

LIITE 2: KingFisher Flex eristyksen pikaohje (ennen ohjelmistopäivitystä)

5.7.2012

KingFisher PCR eristys

- Pipetoi ensin pesuliuokset isoihin pesublokkeihin monikanavapipetillä:
 - 1.pesu AW1 800 µl
 - 2.pesu AW1 500 µl
 - 3.pesu AW2 500 µl
 - 4.pesu AW2 500 µl
 - 5.pesu Tween-vesi 600 µl
 - 6.pesu AE 150 µl (=eluutio)
- Lisää 400 µl 871-liuosta ja 400 µl maitonäytettä putkiin.
- Sekoita näytteet ja sentrifugoi 3 min.
- Poista neste (900 µl) pipetoimalla. Volume hitaalle.
- Lisää 100 µl 872. Pumppaa ja siirrä blokille(=lysaatti) samoilla kärjillä.
- Käynnistä KingFisher PathoProof-ohjelma ja täytä kone.
- Lisää 40 µl 873 käsipipetillä! Laita koneeseen.
- Valmista seos (RTL + etanoli + MagAttract)
Lisää 440 µl seosta blokille ja laita koneeseen.
- Tyhjennä kone ja sulje näyteblokki teipillä.

KingFisher eristyksen ReM-seoksen valmistus.

RTL 200µl per näyte + 10 ylimääräistä
 etanoli —||—
 Mag. —||—

1 levy

(22näytettä+E0+PCR0)

Lisättävä aine	
buffer RTL	6400
etanoli	6400
MagAttract	1280

2 levy

(45näytettä+E0+2PCR0)

Lisättävä aine	
buffer RTL	11000
etanoli	11000
MagAttract	2200

3 levy

(68näytettä+E0+3PCR0)

Lisättävä aine	
buffer RTL	15600
etanoli	15600
MagAttract	3120

4 levy

(91näytettä+E0+4PCR0)

Lisättävä aine	
buffer RTL	20200
etanoli	20200
MagAttract	4040